
Aus dem Institut für Humangenetik der Ludwig Maximilian Universität München
Direktorin: Prof. Dr. med. Ortrud Steinlein

Analyse neuer zytogenetischer und etablierter Prognosefaktoren bei der
chronisch lymphatischen Leukämie (CLL)

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilian-Universität zu München

vorgelegt von
Cathrine Haller

aus
Rosenheim

2014

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. Lars Lindner

Mitberichterstatter Priv. Doz. Dr. Irmela Jeremias
Prof. Dr. Elke Holinski-Feder

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. Christine Mayr

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 17.07.2014

Eidesstattliche Versicherung

Cathrine Haller

Ich erkläre hiermit an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

„Analyse neuer zytogenetischer und etablierter Prognosefaktoren bei der chronisch
lymphatischen Leukämie (CLL)“

selbstständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel
bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd
übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter
Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder
in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen
Grades eingereicht wurde.

Ort, Datum

Cathrine Haller

Danksagung

Herrn PD Dr. Lars Lindner möchte ich für die Betreuung meiner Dissertation danken.

Ein besonderer Dank gilt Frau Dr. Christine Mayr für die Überlassung des Themas dieser Arbeit und die Mitbetreuung.

Herrn Universitätsprofessor Dr. Michael Speicher möchte ich für die Möglichkeit der Anfertigung dieser Promotionsarbeit in seinem Institut danken.

Nicht zuletzt möchte ich meinen Eltern danken, ohne deren Unterstützung mein Studium nicht möglich gewesen wäre.

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 1. | Einleitung | 4 |
| 1.1. | Chronische lymphatische Leukämie | 4 |
| 1.1.1. | Inzidenz und Epidemiologie | 4 |
| 1.1.2. | Ätiologie | 5 |
| 1.1.3. | Pathogenese | 5 |
| 1.1.4. | Symptome, Diagnose und Krankheitsverlauf | 6 |
| 1.1.4.1. | Symptome bei Erstdiagnose | 6 |
| 1.1.4.2. | Diagnose | 7 |
| 1.1.4.3. | Krankheitsverlauf | 8 |
| 1.2. | Prognosefaktoren | 9 |
| 1.2.1. | Stadieneinteilung nach Rai und Binet | 9 |
| 1.2.2. | Zusätzliche Prognosefaktoren | 11 |
| 1.2.3. | Beta-2-Mikroglobulin | 12 |
| 1.2.4. | Serum-Thymidinkinase | 12 |
| 1.2.5. | Immunglobulin-VH-Mutationsstatus | 13 |
| 1.2.6. | CD38-Expression | 14 |
| 1.2.7. | ZAP-70-Expression | 15 |
| 1.2.8. | Zytogenetische Analyse der Interphase mit Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (I-FISH) | 16 |
| 1.2.9. | Zytogenetische Analyse der Metaphase mit Multiplex-Fluoreszenz-in-situ Hybridisierung (M-FISH) | 18 |
| 1.3. | Fragestellung | 18 |
| 2. | Material und Methoden | 20 |
| 2.1. | Patientenkollektiv | 20 |
| 2.2. | Immunophänotypisierung: Oberflächenmarkerbestimmung mittels Durchflusszytometrie (FACS) | 20 |
| 2.2.1. | Präparation der Zellen | 21 |
| 2.2.2. | Antikörperfärbung | 22 |
| 2.2.3. | Fluoreszenzaktivierte Zellanalyse (FACS-Analyse) | 22 |
| 2.2.4. | Statistische Auswertung | 23 |
| 2.3. | Ermittlung zytogenetischer Aberrationen mittels Interphase-Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (I-FISH) | 24 |
| 2.3.1. | Gewinnung mononuklearer Zellen aus dem peripheren Blut | 24 |
| 2.3.2. | Vorbehandlung der Präparate | 25 |
| 2.3.3. | I-FISH spezifische Sonden | 26 |
| 2.3.3.1. | Amplifikation von Sonden mittels ALU- und DOP-PCR | 27 |

| | |
|---|-----------|
| 2.3.3.2. Markierung der Sonden: Nicktranslation | 29 |
| 2.3.3.3. DNase 1-Verdau | 31 |
| 2.3.3.4. Ethanolfällung | 31 |
| 2.3.3.5. In-situ-Hybridisierung der Sonden | 33 |
| 2.3.3.6. Nachweis | 33 |
| 2.3.4. Mikroskopische Aufnahmen | 34 |
| 2.3.5. Statistische Auswertung | 35 |
| 2.4. Ermittlung zytogenetischer Aberrationen mittels Multiplex-Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (M-FISH) | 35 |
| 2.4.1. Stimulation der CLL-Zellen mit CD40 Ligand (CD40L) und CpG-Oligodeoxynukleotiden (CpG-ODN) und Interleukin-2 (IL-2) | 35 |
| 2.4.1.1. Stimulation mit CD40L | 36 |
| 2.4.1.2. Stimulation mit CpG-ODN und IL-2 | 36 |
| 2.4.2. M-FISH spezifische Sonden | 37 |
| 2.4.2.1. Amplifikation der DNA-Sonden mittels DOP-PCR | 38 |
| 2.4.2.2. Markierung der Sonden: Nicktranslation | 42 |
| 2.4.2.3. DNase 1-Verdau | 42 |
| 2.4.2.4. Ethanolfällung | 43 |
| 2.4.2.5. Hybridisierungsmix und Hybridisierung | 43 |
| 2.4.2.6. Vorbehandlung der Präparate | 44 |
| 2.4.2.7. Nachweis | 44 |
| 2.4.3. Epifluoreszenz-Mikroskopie und Bildanalyse | 45 |
| 2.4.4. Statistische Auswertung | 45 |
| 2.5. Zusammenfassende Statistik | 45 |
| 3. Ergebnisse | 47 |
| 3.1. Auswertung der klinischen Daten, Laborparameter und des IgVH-Gen-Mutationsstatus | 47 |
| 3.1.1. Einfluss klinischer Daten auf den Verlauf der CLL | 47 |
| 3.1.2. Einfluss der Laborparameter und des IgVH-Gen-Mutationsstatus auf den klinischen Verlauf der CLL | 49 |
| 3.2. Statistische Auswertung der Immunophänotypisierung: CD38-Expression | 50 |
| 3.3. Auswertung der I-FISH Untersuchung | 51 |
| 3.3.1. Statistische Auswertung | 51 |
| 3.3.2. Bilder | 56 |
| 3.4. Auswertung der M-FISH Untersuchungen | 57 |
| 3.4.1. Statistische Auswertung | 57 |

| | |
|---|------------|
| 3.4.1.1. Translokationen | 61 |
| 3.4.1.2. Komplex aberrante Karyotypen | 70 |
| 3.4.1.3. Vergleichende Analyse der etablierten und neuen Prognosefaktoren | 72 |
| 3.4.2. Bilder | 74 |
| 4. Diskussion | 78 |
| 4.1. Vergleichende Analyse der etablierten Faktoren und deren Einfluss auf die Prognose | 79 |
| 4.1.1. Klinische Daten und Laborparameter | 79 |
| 4.1.2. IgVH-Gen-Mutationsstatus | 79 |
| 4.1.3. CD38-Expression | 80 |
| 4.1.4. I-FISH | 81 |
| 4.2. Analyse der M-FISH Untersuchung und deren Einfluss auf die Prognose | 82 |
| 4.2.1. Translokationen | 83 |
| 4.2.2. Komplex aberrante Karyotypen | 85 |
| 5. Zusammenfassung | 88 |
| 6. Literaturverzeichnis | 90 |
| 7. Anhang | 101 |
| 7.1. Verwendete Reagenzien im Material- und Methodenteil | 101 |
| 7.1.1. SSC (20×): Natriumchlorid/ Natriumcitrat | 101 |
| 7.1.2. 4× SSC/ 0,2% Tween 20 | 101 |
| 7.1.3. PBS (10×): Phosphate Buffered Saline | 101 |
| 7.1.4. TAE- Puffer (50×): Tris/ Acetat/ EDTA | 102 |
| 7.1.5. FACS-Puffer-Lösung | 102 |
| 8. Lebenslauf | 103 |

1. Einleitung

1.1. Chronische lymphatische Leukämie

Der erste Fall einer B-Zell-assoziierten chronisch lymphatischen Leukämie (B-CLL) wurde um 1840 von Bennett und Virchow beschrieben, wobei die Erkrankung post mortem diagnostiziert wurde. Den ersten lebenden Fall beschrieb Fuller 1846. Die damals beschriebenen Fälle litten vor allem an einer Lymphadenopathie (Hamblin 2000). In den 60-er Jahren des 20. Jahrhunderts wusste man zwar bereits schon fast alles über die Klinik der Erkrankung, doch war man sich damals der Bedeutung und Funktion der Lymphozyten noch nicht bewusst und hatte deshalb auch noch nicht die Ursache der CLL erkannt. Erst später wurde die CLL als leukämisch verlaufendes, niedrig malignes Non-Hodgkin-Lymphom beschrieben, das durch die monoklonale Expression von kleinzelligen Lymphozyten charakterisiert ist (Fialkow et al. 1978). Die Lymphozyten gehören in über 95% der Fälle der B-Zellreihe, in nur 5% der T-Zellreihe an.

1.1.1. Inzidenz und Epidemiologie

Die CLL ist mit einer Inzidenz von 3/100.000 Einwohner pro Jahr das häufigste Non-Hodgkin-Lymphom (11%) und die häufigste Leukämie des Erwachsenen in den westlichen Ländern. Ihr Anteil liegt in Europa und den USA zwischen 25-30% der Erwachsenen-leukämien. In China und Japan erkranken 90% weniger Patienten (Nishiyama et al. 1969). Patienten unter 40 Jahren erkranken nur selten an der CLL, wobei es in den letzten Jahren aufgrund der verbesserten medizinischen Versorgung und engmaschigeren Blutbildkontrollen zu vermehrten Diagnosen bei jüngeren Patienten kam. Nur 20% der Patienten sind jünger als 55 Jahre (Mauro et al. 1999). Das mediane Alter bei Erstdiagnose ist 69,6 Jahre (Diel et al. 1999). Die Inzidenz steigt exponentiell mit Zunahme des Patientenalters und erreicht kein Plateau, wobei Männer zwei Mal häufiger erkranken als Frauen und eine schlechtere Prognose haben.

1.1.2. Ätiologie

Die Ätiologie der CLL ist noch ungeklärt. Ein vermehrtes Auftreten wurde bei Arbeitern aus der gummiverarbeitenden Industrie und Landwirtschaft, sowie bei Rauchern und Personen mit einer hohen Exposition gegenüber Benzenen, Asbest und Pestiziden beobachtet.

Deshalb wurde diskutiert, ob Umweltfaktoren und chronische Infekte eine Rolle spielen. Die Kausalität ist jedoch noch unklar (Keating 1999).

Ein vermehrtes Vorkommen der CLL wird vor allem bei weiblichen Patienten mit Autoimmunerkrankungen (Cuttner et al. 2005: 20% vs. 7% in der Kontrollgruppe; $P < 0,001$), aber auch bei Patienten mit Virusinfektionen ($P = 0,002$) und multipler Sklerose ($P = 0,03$) beschrieben (Cartwright et al. 1987).

Ionisierende Strahlen, Medikamente, Chemikalien und Retroviren haben keinen ätiologischen Einfluss (Hallek et al. 2006). Auch konnte kein eindeutiger Zusammenhang mit Hepatitis C Infektionen gefunden werden (Gharagozloo et al. 2001; Duberg et al. 2005). Aufgrund der erheblich niedrigeren Inzidenz in Asien und bei asiatischen Emigranten werden genetische Faktoren vermutet. Bei Verwandten ersten Grades liegt ein 2,7-fach erhöhtes Erkrankungsrisiko vor (Cuttner et al. 1992). Dies deutet auf eine vererbte genetische Disposition hin.

1.1.3. Pathogenese

Pathogenetisch beruht die CLL in 95% der Fälle auf einer monoklonalen Expansion von B-Vorläuferzellen, welche im Blut, im Knochenmark und in den primären und sekundären lymphatischen Organen aufgrund ihrer verlängerten Überlebenszeit und einer verkürzten Proliferationsrate akkumulieren und zur Insuffizienz dieser Organe führen. Morphologisch handelt es sich um reife B-Zellen, die jedoch immunologisch inkompetent sind. Dadurch, und durch die Verdrängung der gesunden B- und T-Lymphozyten durch die malignen B-Zellen, sind die Patienten im Verlauf der Erkrankung anfälliger für mikrobielle Infektionen und Zweittumore. Der Ursprung der Zellen ist letztendlich nicht geklärt.

Im Laufe der normalen B-Zell-Reifung kommt es bei 50% der B-Zellen durch Antigenkontakt im Lymphfollikel zu somatischen Hypermutationen in den Immunglobulin-Genregionen der Schwer- und Leichtkettenvariablen-Region (IgVH- und IgVL-Region). Dabei handelt es sich um im postgerminalen Zentrum stimulierte B-Gedächtniszellen. B-Zellen mit unmutierten IgVH-Genen sind in einem naiven Zustand. Man nimmt an, dass beide Zelltypen von einer gemeinsamen Ursprungszelle ausgehen (Damle et al. 1999; Hamblin et al. 1999).

In 5% der Fälle tritt eine CLL der T-Lymphozyten auf. Diese Entität wird nach neuer Nomenklatur T-PLL (T-Zell prolymphozytische Leukämie) genannt.

1.1.4. Symptome, Diagnose und Krankheitsverlauf

1.1.4.1. Symptome bei Erstdiagnose

Die CLL wird in den meisten Fällen im Frühstadium der Erkrankung diagnostiziert. Ein Großteil der Patienten bemerkt zuerst eine schmerzlose Schwellung der Lymphknoten. Am häufigsten sind die zervikalen Lymphknoten betroffen. Bei circa 20% der Patienten treten überhaupt keine Symptome auf. Hier wird die CLL als Zufallsbefund bei einer Routineblutuntersuchung diagnostiziert. 5-10% der Patienten leiden an B-Symptomen. Von B-Symptomen spricht man, wenn ein oder mehrere der folgenden Symptome bei einem Patienten vorliegen:

- ungewollter Gewichtsverlust von $\geq 10\%$ des Körpergewichts in den letzten sechs Monaten
- Fieber über $>38,0^{\circ}\text{C}$ über einen Zeitraum von über zwei Wochen ohne Nachweis einer Infektion
- Nachtschweiß ohne Nachweis einer Infektion

Bei der weiteren Diagnostik können zusätzlich Veränderungen des Blutes und der primären und sekundären lymphatischen Organe beobachtet werden.

Lymphadenopathien

50-90% der Patienten leiden an einer lokalen oder generalisierten Lymphadenopathie. Die Lymphknoten bei der CLL sind rund, hart und frei unter der Haut verschieblich. Die Vergrößerung der Lymphknoten reicht von wenigen Millimetern bis zu über 10cm im Durchmesser. Am häufigsten sind die zervikalen, supraklavikulären, axillären und inguinalen Lymphknoten betroffen, es kommen aber auch Lymphknotenschwellungen an Stellen des Körpers vor, an denen sich typischerweise keine Lymphknoten befinden (zum Beispiel am Thorax oder über dem Sakrum). Die Lymphknoten können auch zu großen Lymphknotenpaketen verschmelzen.

Splenomegalie

In 25-55% der Fälle ist die Milz bei CLL-Patienten vergrößert. Die vergrößerte Milz ist ebenso wie die Lymphknoten schmerzlos und mit einer glatten Oberfläche und einer scharfen Kante palpabel. Die Milz kann nur wenige Zentimeter vergrößert sein, teilweise aber sogar bis in das kleine Becken und das rechte Abdomen reichen.

Hepatomegalie

Bei Erstdiagnose kann bei 15-25% der Patienten eine Hepatomegalie nachgewiesen werden. Meist ist die Leber nicht sehr stark vergrößert (2-6cm unter dem rechten Rippenbogen palpabel), nicht druckschmerzhaft und hat eine weiche Oberfläche.

Beteiligung anderer Organe

Jedes andere lymphatische Gewebe kann theoretisch vergrößert sein, zum Beispiel der Waldeyer'sche Rachenring oder die Tonsillen. Auch nicht-lymphatische Gewebe können von den CLL-Zellen infiltriert werden, am häufigsten (5%) treten Läsionen der Haut auf.

Lymphozytose

Bei der CLL findet man eine Lymphozytose im peripheren Blut und im Knochenmark. Der Grenzwert zur Diagnose der CLL liegt bei $>15.000/\mu\text{l}$ (Normalwert $<2.500/\mu\text{l}$) und ist damit sehr hoch angesetzt, um falsch positive CLL-Diagnosen zu vermeiden. Wenn allerdings andere Diagnosekriterien vorliegen, kann eine CLL auch bei einer absoluten Lymphozytose von $>5.000/\mu\text{l}$ bzw. $>10.000/\mu\text{l}$ diagnostiziert werden.

1.1.4.2. Diagnose

Zur Diagnose der CLL müssen nur zwei Untersuchungen durchgeführt werden: Ein Blutbild mit Blutaussstrich und Differentialblutbild, sowie eine Immunphänotypisierung der leukämischen Zellen. Sowohl eine zytologische, als auch eine histologische Untersuchung (zum Beispiel von Lymphknoten oder Knochenmark) sind für die Diagnosestellung nicht notwendig (Binet et al. 2006).

Die Diagnosekriterien wurden durch die National Cancer Institut-sponsored Working Group festgelegt und aktualisiert (Cheson et al. 1996; Hallek et al. 2008):

- Lymphozytose im peripheren Blut mit mindestens >5000 Zellen/ μl
- Immunphänotypisierung der Lymphozyten des peripheren Blutes: Expression typischer B-Zell-Marker (CD19, CD20, CD23) und des T-Zell-Markers (CD5);

schwache Expression der Oberflächenmembranimmunglobuline;

Leichtkettenrestriktion (κ - oder λ -Typ) als Hinweis auf die Monoklonalität der Zellen

- Charakteristisch sind kleine, morphologisch reife Lymphozyten mit schmalen Zytoplasmasaum, dichtem Kern, teils verklumptem Chromatin ohne sichtbare Nukleoli, sowie Gumprecht'schen Kernschatten

1.1.4.3. Krankheitsverlauf

Der klinische Verlauf der Erkrankung ist extrem variabel. Das Gesamtüberleben liegt ab dem Zeitpunkt der Erstdiagnose zwischen 24 und 240 Monaten (Hallek et al. 2006). In mehr als 70% der Fälle hat die CLL, vor allem unter Rücksichtnahme des Alters der Patienten, einen sehr benignen Verlauf, und die meisten Patienten befinden sich in einem nicht therapiebedürftigen Stadium der Erkrankung. Bei den restlichen 30% verläuft die CLL sehr individuell, so dass aufgrund des Risikoprofils des Patienten eine Prognose gestellt werden muss.

Aufgrund der Knochenmarkinfiltration kommt es im fortgeschrittenen Stadium der CLL zu einer durch die Verdrängung der Tumorzellen bedingten hämatopoetischen Insuffizienz. Folglich leiden die Patienten an Müdigkeit, Schwäche, Blutungskomplikationen und einer Infektanfälligkeit. Als weitere Komplikation können in bis zu 20% der Fälle Autoimmunzytopenien auftreten (Mauro et al. 2000). Die häufigste Todesursache sind Infektionen, gefolgt von Blutungen und Tumorkachexie.

Bei bis zu 5% der Patienten kommt es zu einer Transformation in eine Prolymphozytenleukämie oder in ein hochmalignes Non-Hodgkin-Lymphom (Richter-Syndrom). Davon sind signifikant mehr jüngere Patienten betroffen (Mauro et al. 1999: 5,9% vs. 1,2%; $P < 0.0001$), außerdem wurde ein erhöhtes Risiko für Zweitkarzinome (Bronchialkarzinom, Hirntumore, intraokulares und malignes Melanom, Hodgkin-Lymphome) beobachtet (Travis et al. 1992). Galton (Galton 1966) beschrieb bereits 1966 eine proliferative Variante der CLL mit einer schlechten Prognose (20-30% der Patienten) und eine stetige Variante der Erkrankung mit einem milden Verlauf. Seither ist es Teil der gegenwärtigen Forschung die Prognosefaktoren ausfindig zu machen.

1.2. Prognosefaktoren

1.2.1. Stadieneinteilung nach Rai und Binet

Rai und Binet entwickelten 1975 und 1981 ein System zur Einteilung der Krankheitsstadien, um die Prognose für den Verlauf der Erkrankung besser zu bestimmen und die Patienten individuell behandeln zu können. Die Einteilung nach Rai erfolgt in fünf alphabetische Gruppen, die mit römischen Ziffern beschrieben werden und vor allem in Nordamerika angewandt wird; die Einteilung nach Binet in drei alphabetische Gruppen wird vorwiegend in Europa verwendet.

Nach Rai und Binet kann die Prognose der einzelnen Patienten grob abgeschätzt werden. Die Stadieneinteilung erfolgt nach klinischen Daten und Laborparametern.

Stadieneinteilung nach Rai (1975)

Tabelle 1: Stadieneinteilung nach Rai (Rai et al. 1975)

| Stadium | Definition | Medianes Überleben |
|--|---|--------------------|
| -Niedriges Risiko 0 | Lymphozytose >15.000/μl Knochenmarkinfiltration >40% | >10 Jahre |
| -Intermediäres Risiko I II | Lymphozytose und Lymphadenopathie Lymphozytose und Hepatomegalie und/ oder Splenomegalie (mit/ ohne Lymphadenopathie) | 7 Jahre |
| -Höchstes Risiko III IV | Lymphozytose und Anämie mit Hb <11,0g/dl, mit/ ohne Lymphadenopathie und/oder Organomegalie Lymphozytose und Thrombopenie <100.000/μl, mit/ ohne Anämie, Lymphadenopathie, Organomegalie | 1,5 Jahre |
| Hb=Hämoglobin Es zählen die Untersuchungsergebnisse der körperlichen palpatorischen Untersuchung. | | |

Stadieneinteilung nach Binet (1981)

Tabelle 2: Stadieneinteilung nach Binet (Binet et al. 1981)

| Stadium | Definition | Medianes Überleben |
|---|---|--------------------|
| A (Niedriges Risiko) | Hb >10,0g/dl, Thrombozytenzahl >100.000/μl, <3 vergrößerte Lymphknotenregionen | >10 Jahre |
| B (Intermediäres Risiko) | Hb >10g/dl, Thrombozytenzahl >100.000/μl, ≥3 vergrößerte Lymphknotenregionen | 7 Jahre |
| C (Hochrisiko) | Hb ≤10,0g/dl, und/ oder Thrombozytenzahl <100.000/μl, unabhängig von der Zahl der befallenen Lymphknotenregionen | 2 Jahre |
| Zervikale, axilläre und inguinale Lymphknotenvergrößerungen unilateral oder bilateral, als auch Leber- und Milzvergrößerungen gelten als je eine Region. Es zählen die Untersuchungsergebnisse der körperlichen palpatorischen Untersuchung. Hb=Hämoglobin | | |

Bei einem Drittel der Patienten im Stadium Binet A kann eine „Smoldering CLL“ diagnostiziert werden (Montserrat et al. 1988). Diese Patienten haben einen prognostisch günstigeren Verlauf mit einer nahezu normalen Lebenserwartung und bedürfen keiner Chemotherapie. Merkmale dieser Sonderform der CLL sind:

- Binet Stadium A
- Nicht-diffuse, noduläre Knochenmarkinfiltration
- Hämoglobinspiegel >13g/dl
- Lymphozytenverdopplungszeit >12 Monate
- Absolute Lymphozytenzahl <30.000/μl

Beide Systeme haben die gleiche Aussage: je schwerer ein Patient erkrankt ist, desto schlechter ist seine Prognose.

Bei einer Vielzahl der Patienten wird die CLL aber bereits in einem frühen Stadium der Erkrankung diagnostiziert. Bei ihnen ist es besonders schwer mit dem Stagingssystem nach Rai/ Binet eine richtige Vorhersage für die individuelle Prognose zu treffen.

Die meisten Patienten erkranken an einer milden Form der CLL, mit einem langsamen Progress und einer nahezu normalen Lebenserwartung. Eine Chemotherapie muss meist erst nach einer großen Zeitspanne gegeben werden.

Der andere Teil der Patienten braucht sehr rasch eine aggressive Chemotherapie und hat eine sehr schlechte Prognose. Um die Patienten mit einer raschen Progression frühzeitig von denen mit einer eher guten Prognose zu unterscheiden, müssen zu dem klinischen Staging zusätzliche Prognosefaktoren hinzugezogen werden. Zudem ist es sinnvoll, die Intensität der Therapie für die Patienten auch von den Prognosefaktoren abhängig zu machen.

1.2.2. Zusätzliche Prognosefaktoren

Da circa 10% der Patienten, die sich im Binet Stadium A oder Rai Stadium 0/1 befinden, einen schnellen Progress erleiden und rasch eine Chemotherapie benötigen, liegt das Interesse darin, weitere Faktoren ausfindig zu machen, um die individuelle Prognose zu bestimmen.

Folgende Parameter wurden im Laufe der Jahre als von der Stadieneinteilung unabhängige Prognosefaktoren definiert, die einen ungünstigen Krankheitsverlauf vorhersagen:

- Diffuse, nicht noduläre Knochenmarkinfiltration (Rozman et al. 1984)
- Lymphozytenverdopplungszeit <12 Monate (Montserrat et al. 1986)
- Schlechter körperlicher Allgemeinzustand (Lee et al. 1987)
- Erhöhtes Serum-LDH (Lee et al. 1987)
- Initialer Lymphozytenwert $>50 \times 10^9/l$ (Montserrat et al. 1988)
- Fehlendes Ansprechen auf die erste Chemotherapie mit Alkylanzien (Catovsky et al. 1989)
- Erhöhtes β -2-Mikroglobulin (Hallek et al. 1996)
- Erhöhter Serum-CD23-Spiegel (Safati et al. 1996)
- Erhöhte Serum-Thymidinkinase (Hallek et al. 1999)
- Fehlen von somatischen Hypermutationen der Immunglobulin-VH-Genregion (Hamblin et al. 1999)
- Erhöhter Serum-CD38-Spiegel (cluster of differentiation 38; Damle et al. 1999)
- Zytogenetische Aberrationen: 11q-Deletion, 17p-Deletion (Döhner et al. 1997), Trisomie 12 (Hamblin et al. 1997) und komplexe, kombinierte chromosomale Aberrationen (Döhner et al. 2000)
- Positive ZAP-70-Expression (zeta-chain associated protein kinase 70; Crespo et al. 2003)
- Vorkommen von Translokationen (Mayr et al. 2006)

Im Gegensatz hierzu prognostizieren folgende Parameter einen günstigen Krankheitsverlauf:

- Lymphozytenverdopplungszeit >12 Monate (Montserrat et al. 1986)
- 13q-Deletion (Fitchett et al. 1987; Stilgenbauer et al. 1993)
- Normaler Karyotyp (Juliussen et al. 1990)
- Somatische Hypermutation der Immunglobulin-VH-Genregion (Hamblin et al. 1999)

Im Weiteren wird genauer auf ausgewählte Prognosefaktoren eingegangen, die sich im Laufe der Jahre etabliert haben und auch heute noch eine wichtige Rolle bei der klinischen Betreuung von Patienten mit CLL spielen.

1.2.3. Beta-2-Mikroglobulin

Beta-2-Mikroglobulin ist ein MHC-Molekül der Klasse I, das alle kernhaltigen Zellen, besonders aber Lymphozyten und Monozyten, an der Oberfläche exprimieren. Aufgrund seines niedrigen Molekulargewichts werden 95% des ungebundenen Beta-2-Mikroglobulins im proximalen Tubus der Niere wieder aufgenommen und zu Aminosäuren abgebaut. Erhöhte Exkretionsraten weisen auf eine tubuläre Schädigung hin (Cunningham et al. 1974). Bei normaler glomerulärer Filtration weisen erhöhte Serumkonzentrationen auf eine erhöhte Produktion oder Freisetzung von Beta-2-Mikroglobulin hin. Dies ist bei lymphoproliferativen Erkrankungen wie Non-Hodgkin-Lymphomen und zum Beispiel der CLL der Fall. Es konnte ein signifikanter Zusammenhang ($P < 0,01$) zwischen dem Beta-2-Mikroglobulin-Spiegel und dem aktuellen Binet Stadium der Patienten beobachtet werden (Constantinides et al. 1985). Erhöhte Beta-2-Mikroglobulin-Spiegel ($> 3,5 \text{ mg/l}$) korrelieren mit einem kürzeren progressionsfreiem Überleben [Treatment free survival (TFS)] und Gesamtüberleben [Overall survival (OS)] der Patienten (Hallek et al. 1996).

1.2.4. Serum-Thymidinkinase

Die Thymidinkinase ist ein Zellenzym, welches am „salvage pathway“ der DNA-Synthese beteiligt ist. Sie wird in der G1/ S-Phase des Zellzyklus aktiviert und katalysiert mit Hilfe von Adenosin-Triphosphat (ATP) die Konversion von Deoxythymidin zu Deoxythymidin-Monophosphat (dTMP). dTMP wird zu Deoxythymidin-Triphosphat phosphoryliert und steht dann der DNA-Synthese zur Verfügung. Die Thymidinkinase ist somit am Einbau des Nukleosids Thymidin in die DNA beteiligt. Ihre Konzentration ist ein Maß für die Teilungsaktivität der Zellen (Hallek et al. 1992). Vor allem maligne Erkrankungen des hämato-lymphatischen Systems sind durch hohe Zellteilungsraten gekennzeichnet. Bei CLL-Patienten mit einem erhöhten Serum-Thymidinkinase-Spiegel ($> 10 \text{ U/l}$) konnte ein signifikant kürzeres TFS beobachtet werden (Median TFS: 8 Monate vs. 49 Monate, $P < 0,001$). Die Serum-Thymidinkinasewerte korrelieren zudem mit den Binet Stadien (Hallek et al. 1999).

1.2.5. Immunglobulin-VH-Mutationsstatus

Ab den 1990-ern wurden zelluläre-immunophänotypische Studien mit Patienten durchgeführt, die an einer CLL erkrankt waren. Die CLL ist charakterisiert durch die Akkumulation von CD5 positiven B-Zellen. Außerdem sind die Tumorzellen CD19, CD23, CD25, CD69 und CD71 positiv und CD22, Fcγ-Rezeptor IIb und FMC7 negativ.

Immunglobuline (Ig, vor allem IgM und IgD) sind nur spärlich zu finden, CD79b ist niedrig oder nicht vorhanden (Damle et al. 2002).

Anfangs wurde deshalb davon ausgegangen, dass es sich um naive B-Zellen aus der folliculären Mantelzone der Lymphknoten handelt, die bisher keinem Antigenkontakt ausgesetzt waren.

Neuere Daten lassen nun vermuten, dass es sich in mindestens der Hälfte der Fälle um im postgerminalen Zentrum stimulierte B-Gedächtniszellen handelt, da eine signifikante Anzahl von somatischen Mutationen in den Immunglobulin-Genregionen der Schwer- und Leichtketten-Variablen(V)-Region vorkommt. In circa 50-60% der B-CLL-Fälle konnten mutierte V-Gene entdeckt werden (Damle et al. 1999). In wiederum 55% aller Fälle mit V-Gen-Mutationen ist die Schwerekettenregion (IgVH), in circa 42% die Leichtkettenregion (IgVL) betroffen (Ghiotto et al. 2006).

Aufgrund des IgVH-Gen-Mutationsstatus der CLL-Zellen können die Patienten in zwei klinisch unterschiedliche Gruppen aufgeteilt werden. Patienten mit unmutierten VH-Genen haben ein deutlich schlechteres TFS und OS. Demgegenüber haben Patienten mit mutierten VH-Genen ein längeres TFS und OS (Median OS: unmutierte VH-Gene 117 Monate vs. mutierte VH-Gene 293 Monate; $P=0,001$; Hamblin et al. 1999). Diese Beobachtung gilt unabhängig vom aktuellen Binet Stadium des Patienten (unmutierte IgVH-Gene und Binet A: 95 Monate vs. mutierte IgVH-Gene und Binet A: 293 Monate; $P=0,0008$; Hamblin et al. 1999). Die zusätzliche Bestimmung des IgVH-Mutationsstatus zum Rai/ Binet Stadium erlaubt also eine bessere Einschätzung der Prognose von Patienten in frühen Krankheitsstadien und scheint die Patienten zu identifizieren, die trotz eines frühen Krankheitsstadiums einen aggressiven Verlauf erleiden. Der IgVH-Mutationsstatus korreliert mit einigen klinisch relevanten Markern (siehe Tabelle 3).

Einleitung

Tabelle 3: Prognosefaktor IgVH-Mutationsstatus (Damle et al. 1999; Hamblin et al. 1999)

| IgVH-Status | Besondere Merkmale | Prognose |
|---------------------------|--|--|
| Mutierte VH-Gene | ≥2% somatische Mutationen; VH3>VH4>VH1; Niedriges klinisches Stadium; Assoziation mit Del13q14; Assoziation mit <20% Zap-70 positiven Zellen; Assoziation mit CD38 Negativität; Expression von CD39, CD62L, CD71; Typische Zellmorphologie; | Langsamer Progress; Besseres Gesamtüberleben; |
| Unmutierte VH-Gene | <2% somatische Mutationen; Malignere Erkrankung; Fortgeschrittenes Stadium; Assoziation mit Trisomie12; Assoziation mit Del11q23; Assoziation mit Fehlen einer Del13q14; Assoziation mit >20% Zap-70 positiven Zellen; Assoziation mit CD38-Positivität; Expression von CD38, CD40, CD69, HLA-DR; Atypische Zellmorphologie; Komplexere Karyotypen; Kürzere Telomer-Längen; | Schneller Progress; Schlechteres Gesamtüberleben unabhängig vom Binet Stadium; |

Obwohl die Bestimmung des IgVH-Mutationsstatus zur Einschätzung der Prognose sinnvoll ist und der IgVH-Status unabhängig von den anderen Prognosefaktoren ist und im Verlauf der Erkrankung stetig ist, kann sie von den meisten Standardlabors aufgrund mangelnder technischer Voraussetzungen nicht durchgeführt werden (Oscier et al. 2002). Außerdem ist die Bestimmung zu kosten- und zeitaufwendig, um sie als Standarduntersuchung zu übernehmen. Es wurde deshalb nach weiteren Prognosefaktoren gesucht.

1.2.6. CD38-Expression

Als möglicher Ersatz für die Bestimmung des IgVH-Mutationsstatus wurde die Bestimmung der CD38-Expression bei B-CLL-Zellen untersucht. Von großem Vorteil ist hier, dass die CD38-Expression einfach und kostengünstig durchzuführen ist. In multivariaten Datenanalysen konnte festgestellt werden, dass die CD38-Expression mit dem IgVH-Mutationsstatus assoziiert ist; die Ergebnisse weichen jedoch in 30% der Fälle ab. Somit ist es immer noch umstritten, ob die CD38-Expression prognostisch wichtig ist, wenn der IgVH-Mutationsstatus bereits bekannt ist. Außerdem kann sich der CD38-Status im Verlauf der Erkrankung verändern. Ein Patient wird als CD38 positiv bewertet, wenn mindestens 30% der Tumorzellen CD38 exprimieren. Patienten mit <30% CD38 positiven Tumorzellen zeigen

ein längeres TFS und OS (Median OS: CD38 positiv 10 Jahre vs. CD 38 negativ, OS während des Follow-up noch nicht erreicht, $P=0,0001$; Damle et al. 1999).

Die CD38-Expression korreliert mit einigen klinisch relevanten Markern (siehe Tabelle 4).

Tabelle 4: Prognosefaktoren CD38-Expression (Damle et al. 1999)

| CD38-Expression | Besondere Merkmale | Prognose |
|---------------------|---|--|
| CD38 negativ | <30% der Zellen exprimieren CD38 Assoziation mit mutierten IgVH-Genen | Besseres progressionsfreies/ Gesamtüberleben Besseres Ansprechen auf Chemotherapie |
| CD38 positiv | ≥30% der Zellen exprimieren CD38 Assoziation mit unmutierten IgVH-Genen Männer > Frauen | Schlechteres progressionsfreies/ Gesamtüberleben Schlechteres Ansprechen auf Chemotherapie |

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die CD38-Expression keinen idealen Prognosefaktor darstellt.

1.2.7. ZAP-70-Expression

Zeta-chain (TCR) associated protein kinase 70kDa (ZAP-70) ist eine Tyrosinkinase, die essentiell an der T-Zell-Signaltransduktion beteiligt ist. Sie kommt intrazellulär in natürlichen Killerzellen vor und wird normalerweise nicht von B-Zellen exprimiert (Chen et al. 2002). Genetische Untersuchungen konnten zeigen, dass sich Patienten mit mutiertem und unmutiertem IgVH-Gen-Status anhand der Expression bestimmter Gene, wie zum Beispiel der Expression von ZAP-70, unterscheiden (Rosenwald et al. 2001). Die Expression des ZAP-70-Proteins lässt sich schnell und kostengünstig mittels Durchflusszytometrie (FACS) bestimmen.

Zwei große Studien zeigten, dass Patienten mit mutierten IgVH-Genen häufiger eine niedrige ZAP-70-Expression (<20%) haben; Patienten mit unmutierten IgVH-Genen hingegen eine bis zu 5,5-fach höhere ZAP-70-Expression (Rassenti et al. 2004, Wiestner et al. 2003). Liegt die Expression über 20% werden sie als ZAP-70 positiv bezeichnet, liegt sie darunter als ZAP-70 negativ. Die ZAP-70-Expression ändert sich bei den meisten Patienten im Verlauf nicht (Schroers et al. 2005). Die Übereinstimmung des ZAP-70-Status mit dem IgVH-Gen-Mutationsstatus lag in Studien bei bis zu 93% (Wiestner et al. 2003).

ZAP-70 positive Patienten haben ein kürzeres OS (Dürig et al. 2003; OS: Median ZAP-70 positiv 139 Monate vs. Median ZAP-70 negativ nicht erreicht; $P=0,001$).

In multivariaten Datenanalysen zeigte sich die ZAP-70-Expression als unabhängiger Prognosefaktor (Schroers et al. 2005).

Auch im Bereich der Zytogenetik etablierten sich einige Prognosefaktoren. Seit Beginn der systemischen Durchführung moderner Untersuchungstechniken- wie der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)- konnten bei circa 80% der Patienten chromosomale Aberrationen festgestellt werden.

1.2.8. Zytogenetische Analyse der Interphase mit Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (I-FISH)

Die zytogenetischen Untersuchungen bei der CLL wurden bereits in den 1980-ern durchgeführt. Nach der Stimulation von B-Zellen mit B-Zell-Mitogenen wie zum Beispiel TPA (12-O-Tetradecanoyl-Phorbol-13-Acetat) wurden die erhaltenen Metaphasen zytogenetisch untersucht. Obwohl man mit dieser Methode in 40-50% der Fälle chromosomale Aberrationen entdecken konnte, wurde diese Technik recht bald durch die Interphase-Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (I-FISH) ersetzt, da die CLL-Zellen nur schlecht auf die herkömmlichen Mitogene reagierten, oder es sich bei den gefundenen Zellen mit normalem Karyotyp um nichtleukämische T-Lymphozyten handelte.

Heutzutage wird die Chromosomenanalyse noch hauptsächlich mit I-FISH durchgeführt. Man verwendet hierfür verschiedene Sonden, die für Chromosomenregionen spezifisch sind und die nach dem heutigen Kenntnisstand für die CLL relevante numerische und strukturelle Rearrangements beinhalten.

Die häufigste strukturelle Aberration ist die Deletion des Chromosoms 13q- (in circa 50%), die mit einer guten Prognose vergesellschaftet ist (Median TFS: 92 Monate, Median OS: 133 Monate; Döhner et al. 2000). Es folgen die Deletion des Chromosoms 11q- in circa 10-20% (Median TFS: 13 Monate, Median OS: 79 Monate, Döhner et al. 2000) und 17p- in circa 10-20% (Median TFS: 9 Monate, Median OS: 32 Monate; Döhner et al. 2000), sowie die Trisomie des Chromosoms 12 in circa 15-30% (Median TFS: 33 Monate, Median OS: 114 Monate; Döhner et al. 2000), die alle mit einer schlechten Prognose in Zusammenhang gebracht werden. Seltener beobachtet man eine Deletion des Chromosoms 6q- (in circa 6%). Hierfür konnte kein schlechteres progressionsfreies Überleben und Gesamtüberleben definiert werden (Median TFS: Del 6q- 43 Monate vs. 41 Monate in der Kontrollgruppe, Median OS: Del 6q- 131 Monate vs. 132 Monate in der Kontrollgruppe; P=0,26; Stilgenbauer et al. 1999).

Patienten mit einem normalen Chromosomensatz haben eine bessere Prognose als Patienten mit einer Deletion 11q- oder 17p-, jedoch eine schlechtere Prognose als Patienten mit einer Deletion 13q- (Stilgenbauer et al. 2000).

Einleitung

Tabelle 5 zeigte eine Übersicht häufiger Aberrationen und anderer klinisch relevanter Marker.

Tabelle 5: Häufige Aberrationen bei der CLL und ihre Prognose (Döhner et al. 1995; Stilgenbauer et al. 1999; Stilgenbauer et al. 2000)

| Genregion | Besondere Merkmale | Prognose |
|--|---|--|
| Del6q21-q23 (in 66%) Del6q25-q27 (in 33%) | Bei circa 6% der Patienten; Höhere Leukozytenzahlen; Größere Tumormassen; Kein Nachweis eines Tumorsuppressorgens; | Kein schlechteres progressionsfreies/ Gesamtüberleben; |
| Del11q22.3-q23.1 | Bei circa 15-20% der Patienten; Ausgeprägte Lymphadenopathie und B-Symptomatik; Jüngere Patienten; Höhere klinische Stadien; Tumorsuppressorgene: ATM (ataxia teleangiectasia mutated), RDX (radixin), FDX1; | Schlechteres progressionsfreies/ Gesamtüberleben (bei Patienten unter 55 Jahren); Hohe Inzidenz für autologe Stammzelltransplantation; Schlechtes Ansprechen auf Chemotherapie; |
| Del13q14 (Single) | Bei circa 50% der Patienten; Tumorsuppressorgene: zwischen RB-1 (Retinoblastom-Gen) und D13S25 gelegen; | Besseres progressionsfreies/ Gesamtüberleben; |
| Del17p- | Bei circa 10-20% der Patienten; Verlust von Tumorsuppressorgenen: p53; Mutation von p53 Purinanaloga-Resistenz; | Schlechteres progressionsfreies/ Gesamtüberleben; Schlechtes Ansprechen auf Chemotherapie; |
| Trisomie 12 | Bei circa 15-30% der Patienten; Assoziation mit unmutierten IgVH-Genen; | Schlechteres progressionsfreies/ Gesamtüberleben; |
| Normaler Karyotyp | Bei circa 20% der Patienten; | Mittleres progressionsfreies/ Gesamtüberleben; |

Eine Frage die beantwortet werden soll ist, ob diese bekannten Aberrationen alle häufigen Aberrationen bei der CLL darstellen, oder ob es vielleicht andere Aberrationen gibt, die bisher übersehen wurden. Die Technik mit I-FISH erlaubt es allerdings nicht, einen größeren Chromosomensatz auf neue Aberrationen zu untersuchen und somit neue zytogenetische Marker beziehungsweise Prognosefaktoren zu etablieren.

1.2.9. Zytogenetische Analyse der Metaphase mit Multiplex-Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (M-FISH)

Neue und unbekannte Aberrationen lassen sich nur mit Metaphasen untersuchen. Anfangs wurden CLL-Zellen mit den Mitogenen PMA und TPA stimuliert. In dem Großteil der Fälle führt das zur Proliferation von T-Lymphozyten und dadurch zu einem normalen Karyotyp, da die T-Lymphozyten die Aberrationen der Leukämiezellen nicht aufweisen. Da sich neue Aberrationen mit der I-FISH Methode nicht darstellen lassen, mussten die B-CLL-Zellen mit einer neuen Technik behandelt werden, um Metaphasen von ihnen zu erhalten und eine detaillierte Chromosomenanalyse durchführen zu können. Dies hat sich in der Vergangenheit immer wieder als problematisch erwiesen. Mit der Stimulation der Zellen mit CD40 Ligand (CD40L) (Buhmann et al. 1999 und 2002) oder mit einer Kombination aus CpG-Oligodeoxynukleotiden (CpG-ODN) und Interleukin-2 (IL-2) (Decker et al. 2000) können nun gute Metaphase-Ergebnisse erzielt werden und mit M-FISH (Speicher et al. 1996) auf Aberrationen untersucht werden (Mayr et al. 2006). Neben den bereits im I-FISH gefundenen Aberrationen konnten in 34% der Fälle auch chromosomale Translokationen entdeckt werden. Betroffene Patienten hatten hinsichtlich des TFS und OS eine schlechtere Prognose (Median TFS: 24 Monate vs. 106 Monate; $P < 0,001$; Median OS: 94 Monate vs. 346 Monate; $P < 0,001$; Mayr et al. 2006). Dieser neue Prognosefaktor könnte zur genaueren individuellen Prognosebestimmung hilfreich sein. Die Patienten, die von Mayr et al. 2006 untersucht wurden, waren jedoch größtenteils schon in einem fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung und häufig bereits vorbehandelt. Deswegen könnten die Translokationen auch durch die Behandlung der Patienten mit Chemotherapie entstanden sein. Eine andere Möglichkeit besteht darin, dass die Translokationen erst spät im Krankheitsverlauf auftreten und dadurch mit einer schlechten Prognose assoziiert sind.

1.3. Fragestellung

In den vergangenen Jahren gab es große Fortschritte bezüglich der Risikostratifizierung bei CLL-Patienten. Ziel ist es, unter Einbeziehung der individuellen Prognosefaktoren, eine optimale, risikoadaptierte Therapie für den Patienten zu finden. Trotz der Etablierung verschiedener klinischer, serologischer, immunologischer und zytogenetischer Einzelfaktoren gelang es bisher noch nicht ein für alle Patienten ausreichendes Risikoprofil anlegen zu können.

In der vorliegenden Doktorarbeit soll untersucht werden, ob eine zytogenetische Untersuchung der CLL-Patienten mit M-FISH zur Risikostratifizierung besser geeignet ist als

Einleitung

bisher etablierte Methoden, insbesondere dann, wenn unbehandelte Patienten, oder Patienten die sich in einem frühen Krankheitsstadium befinden, untersucht werden. Eine M-FISH Untersuchung könnte somit eine sinnvolle Ergänzung der bisherigen Prognoseparameter darstellen.

2. Material und Methoden

2.1. Patientenkollektiv

Zwischen September 2004 und November 2005 wurden im humangenetischen Institut der Technischen Universität München das periphere Blut und die klinischen Daten von 146 CLL-Patienten untersucht. In allen Fällen basierte die klinische Diagnose der CLL auf standardisierten morphologischen und immunphänotypischen Kriterien. Die Krankheitsverläufe aller Patienten wurden bis ins Frühjahr 2008 verfolgt.

Die verwendeten klinischen Daten und Laborparameter (Erstdiagnose, Binet Stadium, Blutbild, Laborparameter wie Beta-2-Mikroglobulin- und Thyrosinkinase-Spiegel, IgVH-Genmutationsstatus, Art und Anzahl der Vortherapien, Krankheitsverlauf, Überleben) wurden von den jeweiligen behandelnden Ärzten der unterschiedlichen Institutionen (Tumorzentrum der Technischen Universität München; Universitätsklinikum Ulm; Praxis Dr. Hoffmann Norderstedt; Universitätsklinikum Wien; Hanusch Hospital Wien) erhoben.

Die Patienten wurden in Bezug auf das progressionsfreie Überleben [treatment free survival (TFS)] und das Gesamtüberleben [overall survival (OS)] beobachtet.

Für die durchgeführte Studie lag ein Ethikvotum vor.

Da in einer Pilotstudie (Mayr et al. 2006) 7 von 13 Samples, die weniger als $20 \times 10^9/l$ Leukozyten zum Zeitpunkt der Blutuntersuchung hatten, nicht ausreichend durch CD40 Ligand oder CpG-Oligonukleotid stimuliert werden konnten und keine oder zu wenige Metaphasen bildeten, wurden nur Patientenproben stimuliert, die mehr als $20 \times 10^9/l$ Leukozyten enthielten.

2.2. Immunphänotypisierung: Oberflächenmarkerbestimmung mittels Durchflusszytometrie (FACS)

In dieser Arbeit wurden mit Fluoreszenzfarbstoffen markierte Oberflächenmoleküle von B-CLL Lymphozyten von den bereits unter Punkt 2.1. beschriebenen Patienten bestimmt. Die Oberflächenmoleküle CD3, CD5, CD14, CD19 und CD38 wurden mit monoklonalen Antikörpern, die an FITC, PE und PE-Cy5 konjugiert werden, bestimmt. Die Untersuchung fand bei dem Großteil der Patienten zum Zeitpunkt der Erstdiagnose statt.

Tabelle 6: Zuordnung der Oberflächenmoleküle

| Cluster of differentiation (CD) | Zellpopulation |
|---------------------------------|---|
| CD3 | T-Lymphozyten |
| CD5 | T-Lymphozyten/ B-Lymphozyten Subpopulation (CLL-Zellen) |
| CD14 | Monozyten |
| CD19 | B-Lymphozyten |
| CD38 | B-Lymphozyten, Plasmazellen |

2.2.1. Präparation der Zellen

Material

Ficoll Hypaque 1,077g/ml;
Trypan-Blau;
Falconröhrchen 15ml;
Peripheres Blut von 130 CLL-Patienten;
Lichtmikroskop;

Methode

- Die mononuklearen Zellen des peripheren Blutes, die für die I-FISH-Analyse gewonnen wurden (siehe 2.3.1.), werden auch hierfür verwendet.
- Zum Auszählen der Zellzahl werden 20µl der Lymphozytensuspension mit 20µl Trypan-Blau versetzt und unter dem Lichtmikroskop mit einer Neubauer-Zählkammer und unten genannter Formel ausgezählt. Pro Färbung benötigt man mindestens 10^5 Zellen.

$$\text{Gezählte Zellzahl} / 0,1 \times \text{Verdünnung} \times \text{ausgezählte Felder} = \text{Gesamtzellzahl} / \mu\text{l}$$

2.2.2. Antikörperfärbung

Material

Fluoreszenz-markierte Antikörper für CD3, CD5, CD14, CD19, CD38;
FACS-Puffer Lösung (siehe Anhang);
Eisbox;

Methode

- Die 3×10^5 Zellen werden in ein Eppendorfröhrchen pipettiert und 3 Minuten bei 2.500rpm zentrifugiert.
- Überstand abgießen, Zellen kurz aufschütteln und auf drei Röhrchen verteilen. Nach folgendem Schema in Tabelle 7 mit den Antikörperfärbungen bestücken.
- Die Eppendorfröhrchen sofort in eine abgedunkelte Eisbox legen und 30 Minuten bei 4°C inkubieren.
- Färbeansatz mit 1ml FACS-Puffer Lösung waschen und 3 Minuten bei 2.500rpm zentrifugieren.
- Überstand absaugen und erneut mit 500µl FACS-Lösung verdünnen und bis zur Messung bei 4°C abgedunkelt aufbewahren.

Tabelle 7: Antikörperfärbungen

| Mix | FITC-Färbung (grün) | PE-Färbung (gelb) | PE-Cy5 (lila) |
|-----|----------------------------------|-------------------|---------------|
| 1 | ----- Ungefärbter Leerwert ----- | | |
| 2 | CD3 (1,5µl) | CD5 (1,5µl) | CD19 (1,5µl) |
| 3 | CD38 (2µl) | CD14 (1,5µl) | CD19 (1,5µl) |

2.2.3. Fluoreszenzaktivierte Zellanalyse (FACS-Analyse)

Die Durchflusszytometrie (Fluorescence Activated Cell Sorting, FACS) ermöglicht das Zählen und die Analyse von physikalischen und molekularen Eigenschaften von kleinsten Partikeln (zum Beispiel Zellen) in einem Flüssigkeitsstrom.

Zur quantitativen Bestimmung der Oberflächenmoleküle wurde eine FACS-Analyse durchgeführt. Grundlage hierfür ist die Antigen-Antikörperreaktion, die mit Fluoreszenzfarbstoff markierten Antikörpern durchgeführt wird. Antigene sind die jeweiligen CD-Oberflächen-Moleküle.

Die vorbehandelte Lymphozytensuspension wird in einem FACS-Gerät durch hydrodynamische Fokussierung wie an einer Perlenkette an einem gebündelten Laserstrahl geeigneter Wellenlänge vorbeigeleitet. Jedes Fluorochrom hat ein spezifisches Absorptions- und Emissionsmaximum. Die Elektronen der fluoreszierenden Farbstoffe werden durch den monochromatischen Laserstrahl auf ein höheres Energieniveau gehoben, um nach kurzer Zeit unter Abgabe von Photonenenergie auf das ursprüngliche Niveau zurück zu fallen. Die durch einen Detektor registrierte Photonenkonzentration verhält sich proportional zur Anzahl der gebundenen Antikörper pro Zelle. Daraus lässt sich schließen, wie viele Antigene sich auf der Zelloberfläche befinden.

Die Analyse wurde mit einem FACS-Calibur durchgeführt. Dieses Gerät verfügt über einen Argonlaser und eine rote Laserdiode. Somit ist die gleichzeitige Analyse von bis zu vier Farben möglich.

Tabelle 8: Absorptions- und Emissionsmaxima der verwendeten Fluorochrome

| Fluorochrom | Absorptionsmaximum (nm) | Emissionsmaxima (nm) | Abkürzung |
|--------------------------|-------------------------|----------------------|-----------|
| Fluoresceinisothiozyanat | 495 | 519 | FITC |
| Phycoerythrin | 480; 565 | 578 | PE |
| Phycoerythrin-Cyanin5 | 488 | 669 | PE-Cy5 |

2.2.4. Statistische Auswertung

Bei jeder Probe wurde eine Messung mit dem ungefärbten Leerwert durchgeführt, um die ungefärbten Zellen zu definieren. Die Tumorphosphorpopulation wurde definiert, indem man die lymphoide Population auf der SCC-FSC-Fläche, und dann die CD5 positive/ CD19 positive Population eingegrenzt („gated“) hat. Der Prozentwert der CD38 positiven Zellen in diesem Gate wurde bestimmt.

Alle untersuchten Proben zeigten >95% CD5/ CD19-Positivität und konnten so als B-CLL-Zellen definiert werden. Bei diesen Zellen wurde der Cut-Off-Level auf >30% CD38 positive B-CLL-Zellen festgelegt, um die CD38 positiven Samples als solche zu identifizieren. Die Daten wurden in univariaten und multivariaten Analysen mit den anderen Prognosefaktoren verglichen. Die Berechnungen erfolgten mit SPSS Vol. 18 (SPSS, Chigaco, IL).

2.3. Ermittlung zytogenetischer Aberrationen mittels Interphase-Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (I-FISH)

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden von Dezember 2004 bis September 2005 von 130 Patienten Blutproben aus fünf unterschiedlichen Institutionen (Tumorzentrum der Technischen Universität München; Universitätsklinikum Ulm; Praxis Dr. Hoffmann Norderstedt; Universitätsklinikum Wien; Hanusch Hospital Wien) auf zytogenetische Aberrationen untersucht. Die Untersuchung fand bei dem Großteil der Patienten zum Zeitpunkt der Erstdiagnose statt.

2.3.1. Gewinnung mononuklearer Zellen aus dem peripheren Blut

Material

Ficoll Hypaque 1,077g/ml;
1x PBS-Lösung (siehe Anhang);
Falconröhrchen 50ml;
Peripheres Blut von 130 CLL-Patienten;

Methode

- 20ml Blut wird mit gleicher Menge PBS gemischt.
- 20ml Ficoll werden in einem 50ml Falconröhrchen mit Blut-PBS-Gemisch überschichtet.
- 30 Minuten Zentrifugation bei 400g und Raumtemperatur.
- Mittlere Phase mit Lymphozyten wird in neues Falconröhrchen überführt.
- Isolierte Lymphozyten werden mit PBS auf 50ml aufgefüllt und 10 Minuten bei 700g und Raumtemperatur zentrifugiert.
- Lymphozyten werden 1-2 Mal mit PBS gewaschen und danach je nach Zellzahl in 1-4ml PBS aufgenommen.

Fixierung

- Die Zellsuspension 10 Minuten bei 800rpm zentrifugieren.
- Überstand bis auf etwa 1ml entfernen und das Pellet auf dem Vortexer resuspendieren.

- Fixativ mit einer Pasteurpipette tropfenweise unter Vortexen hinzugeben und auf circa 4ml auffüllen.
- 10 Minuten bei 1.000rpm zentrifugieren.
- Fixierungsschritt 3-5 Mal wiederholen.
- Nach der letzten Zentrifugation je nach Größe des Pellets den Überstand bis auf 1-2ml absaugen und das Pellet resuspendieren. Die Suspension sollte trüb sein.

Auftropfen

- Mit einer Pasteurpipette 1-3 Tropfen der Zellsuspension auf einen zuvor im Ultraschallbad gereinigten und in kaltem Wasser gelagerten Objektträger auftropfen.
- Sofort nach dem Auftropfen Objektträger auf ein feuchtes Tuch legen, das sich auf einer 37°C warmen Heizplatte befindet, um die Luftfeuchtigkeit zu erhöhen.

Lagerung

- Präparate zunächst 2-3 Tage bei Raumtemperatur lagern und anschließend bis zur Vorbehandlung in 70% Ethanol bei 4°C aufbewahren.

2.3.2. Vorbehandlung der Präparate

Material

Pepsin, Stocklösung 10% (100mg/ml);
2x SSC-Lösung (siehe Anhang);
1x PBS-Lösung (siehe Anhang);
1N HCL-Lösung;
Aufsteigende Alkoholreihe (70%, 90%, 100%);
Präparate von ca. 130 CLL-Patienten;

Methode

Um die Hybridisierungsergebnisse zu verbessern und den Hintergrund zu reduzieren, wird das überschüssige Zytoplasma auf den Chromosomenpräparaten durch das Einwirken von Pepsin entfernt.

- Küvette mit Acqua bidestillata im Wasserbad auf 37°C vorwärmen.
- 500µl 1N HCL dazu pipettieren.
- Präparate kurz in 2x SSC-Lösung äquilibrieren.

- 15µl Pepsin Stocklösung zur 37°C warmen HCl geben, mischen und Präparate sofort in die Küvette stellen. Pepsinierungsdauer je nach Zytoplasmamenge 4-10 Minuten.
- Die Präparate 3x 5 Minuten in 1x PBS-Lösung waschen.
- Dehydrierung der DNA mit Hilfe einer Alkoholreihe: Objektträger jeweils 3 Minuten in 70%, 90% und 100% Ethanol inkubieren.

Denaturierung der Präparate

Für die Hybridisierung muss die DNA auf den Präparaten - genau wie die DNA-Sonden - einzelsträngig vorliegen.

Material

Formamid (reinst);
Denaturierungslösung (70% Formamid), 50ml Volumen;
35ml Formamid;
15ml 2x SSC-Lösung auf pH 7 einstellen;
Aufsteigende Alkoholreihe: Ethanol zu 70%, 90%, 100%;

Methode

Denaturierung der Chromosomenpräparate 4 Minuten in 70% Formamidlösung bei 73°C.

- Entwässerung der Präparate mit aufsteigender Alkoholreihe (70%, 90%, 100%) bei -20°C, je 3 Minuten.
- Präparate lufttrocknen.

2.3.3. I-FISH spezifische Sonden

Unter Verwendung unterschiedlicher Sondenmixe werden Genloki verschiedener Chromosomen visualisiert. Bei den Sonden handelte es sich um alphaide Sequenzen, die in unterschiedlichen Plasmidvektoren kloniert vorliegen und eine Insertlänge von 0,68kb-5,5kb haben.

Tabelle 9: BAC-Sonden-Mix

| BAC-Sonde | Markierung |
|---|----------------|
| Sonde Chromosom 6q21: PAC 963d6 | Texas Red (TR) |
| Sonde Chromosom 11q22-q23: PAC 755b11#1 | Biotin-Cy 3 |
| Sonde Chromosom 13q14: PAC 272/3 | Dig-FITC |
| Sonde Chromosom 17p13: PAC p53 | DEAC |

Die Sonden werden mit Hilfe einer ALU- und DOP-PCR (van Dongen et al, 2003) amplifiziert und anschließend mittels Nicktranslation markiert.

2.3.3.1. Amplifikation von Sonden mittels ALU- und DOP-PCR

ALU-PCR

Material

10x PCR-Puffer: 200mM Tris-HCl (pH 8,4) + 500mM KCl;
 Magnesiumchlorid (MgCl₂), 50mM;
 25μM CL1;
 25μM CL2;
 5mM dNTP's: dATP, dCTP, dGTP, dTTP; je 100mM; pH 7,5;
 Taq-Polymerase, 500Units (5U/μl);
 DNA;
 PCR-Maschine;

Methode

Ansatz der ALU-PCR

Tabelle 10: Ansatz der ALU-PCR

| | Endkonzentration (1x)(μl) Mastermix | Ausgangskonzentration (14x)(μl) Mastermix |
|------------------------|-------------------------------------|---|
| 10x PCR-Puffer | 10 | 140 |
| 50mM MgCl ₂ | 3 | 42 |
| 5mM dNTP's | 5 | 70 |
| 25mM CL1 | 1 | 14 |
| 25μM CL2 | 1 | 14 |
| Taq DNA Polymerase | 1 | 14 |
| ddH ₂ O | 78 | 1092 |

⇒ je 99μl Mastermix aus dem Röhrchen nehmen und 1μl DNA begeben

Programm der ALU-PCR

Tabelle 11: Programm der ALU-PCR

| Schritte | Temperatur (°C) | Zeit (Minuten) |
|---------------------------|-----------------|----------------|
| 1. Anfangsdenaturierung | 96 | 5 |
| 2. Denaturierung | 96 | 1 |
| 3. Annealing | 37 | 0,5 |
| 4. Elongation | 72 | 6 |
| 5. Finale Elongation | 72 | 5 |
| 6. Cooling | 4 | ∞ |
| ⇒ Schritte 2-4: 29 Zyklen | | |

DOP-PCR

Material

10x PCR-Puffer: 200mM Tris-HCl (pH 8.4) + 500mM KCl;
 Magnesiumchlorid (MgCl₂), 50mM;
 5mM dNTP's: dATP, dCTP, dGTP, dTTP; je 100mM; pH 7,5;
 100µM 6 MW;
 Taq-Polymerase, 500Units (5U/µl);
 DNA;
 PCR-Maschine;

Methode

Ansatz der DOP-PCR

Tabelle 12: Ansatz der DOP-PCR

| | Endkonzentration (1x)(µl) Mastermix | Ansatzkonzentration (14x)(µl) Mastermix |
|---|-------------------------------------|---|
| 10x PCR-Puffer | 2,5 | 35 |
| 50mM MgCl ₂ | 1 | 14 |
| 5mM dNTP's | 1 | 14 |
| 100µM 6 MW | 0,5 | 7 |
| Taq DNA Polymerase | 0,2 | 2,8 |
| ddH ₂ O | 18,8 | 264 |
| ⇒ je 24µl des Mastermix aus dem Röhrchen nehmen und 1µl DNA begeben | | |

Programm der DOP-PCR

Tabelle 13: Programm der DOP-PCR

| Schritt | Temperatur (°C) | Zeit (Minuten) |
|---|-----------------|----------------|
| 1. Anfangsdenaturierung | 93 | 10 |
| 2. Denaturierung | 94 | 1 |
| 3. Annealing | 30 | 1,5 |
| 4. Elongation | Ramp 30-70 | 3 |
| 5 Finale Elongation | 72 | 3 |
| 6. | 94 | 1 |
| 7. | 62 | 1 |
| 8. | 72 | 4 |
| 9. | 72 | 10 |
| 10. Cooling | 4 | ∞ |
| ⇒ Schritte 2-5: 4 Zyklen; Schritte 6-9: 34 Zyklen | | |

Zur Kontrolle wird ein 1%-iges Agarosegel angefertigt.

Material

1x TAE-Puffer zur Gelelektrophorese (siehe Anhang);

Agarose NEE0;

Ethidiumbromid, 1% flüssige Lösung;

Gellaufpuffer (siehe Anhang);

Marker: 100 Basenpaar-Leiter, 1µg/ µl (gebrauchsfertige Verdünnung siehe Anhang);

Methode

- 0,6g Agarose in 60ml 1x TAE-Puffer in der Mikrowelle lösen und anschließend diese Lösung kurz abkühlen lassen.
- Nach Zugabe von 0,6µl Ethidiumbromid die Lösung in eine Gelkammer gießen und die Kämme für die Geltaschen aufstecken.
- Nach Erkalten der Agarose, Kämme entfernen, das Gel in das Gelelektrophorese-Gerät einbringen und mit 1x TAE-Puffer circa 0,5cm überschichten.
- 5µl des ALU-Proben-Ansatzes mit je 3µl Orange-Puffer mischen und in die Geltaschen einpipettieren.
- 2µl des DOP-Proben-Ansatzes mit je 2µl Orange-Puffer mischen und in die Geltaschen einpipettieren.
- Zur Kontrolle der Fragmentlänge in eine freie Geltasche einen Längenmarker pipettieren, zum Beispiel einen 100 Basenpaar-Leiter, der alle 100 Basenpaare eine Bande zeigt; bei 500 Basenpaaren und bei 800 Basenpaaren weist der Marker jeweils eine verdickte Bande auf.
- Proben bei Anlegen einer Spannungsdifferenz von 110 Volt bei einem Gel, von 130 Volt bei zwei Gelen im elektrischen Feld von Minus nach Plus ihrer Länge entsprechend auftrennen.
- Anschließend die Banden auf dem Gel mittels eines Geltransilluminators sichtbar machen.

2.3.3.2. Markierung der Sonden: Nicktranslation

Bei der Nicktranslation werden in der zu markierenden DNA mittels DNase 1 Einzelstrangbrüche („nicks“) gesetzt, von denen aus die DNA-Polymerase 1 durch ihre 5´-3´ Exonucleaseaktivität Nukleotide abbaut und durch die gleichzeitige Polymeraseaktivität bei der Reparatursynthese markierte Nukleotide in den DNA-Strang einbaut.

Die Reaktion wird bei 15°C durchgeführt.

Bei der Nicktranslation wird von der zu markierenden DNA ungefähr 1µg eingesetzt.

Material

10x Nicktranslationspuffer (siehe Anhang);
0,1M β -Mercaptoethanol;
0,5mM AGC: dATP, dCTP, dGTP; je 100mM; pH 7,5;
Digoxigenin;
Biotin-Cy3;
Texas Red: Texas Red-12-dUTP, 1mM;
DNA Polymerase 1, Kornberg-Enzym, 5U/µl;
DNase 1 (1:5000 Verdünnung); aus bovinem Pankreas,
Stocklösung 3mg/ml;

Methode

Nicktranslations-Ansatz

Tabelle 14: Nicktranslations-Ansatz

| | Endkonzentration (1x)(µl) Mastermix | Ansatzkonzentration (5x)(µl) Mastermix |
|-------------------------------|---|--|
| 10x NT-Puffer | 5 | 25 |
| 0,1M β -Mercaptoethanol | 5 | 25 |
| 5mM AGC-Mix | 0,5 | 2,5 |
| Fluorochrom | 1 | - |
| Polymerase 1 | 1 | 5 |
| DNase 1 | 5 | - |
| ddH ₂ O | 17,5 | 79,5 |
| DNA | 15 (10 ALU, 5 DOP) bei Sonde 9: 23 (15 ALU, 8 DOP) | |

- Die Nicktranslation erfolgt bis zu 105 Minuten lang in einem 15°C Wasserbad. Nach dem Verdau sollte die DNA zwischen 300 und 600 Basenpaare (bp) lang sein.
- Zur Erfolgskontrolle je 5µl der nicktranslatierten Sonden auf ein 1%-iges Agarosegel auftragen. Falls die Sonden noch zu lang sind (siehe Abbildung 1), ist ein DNase-Nachverdau notwendig.

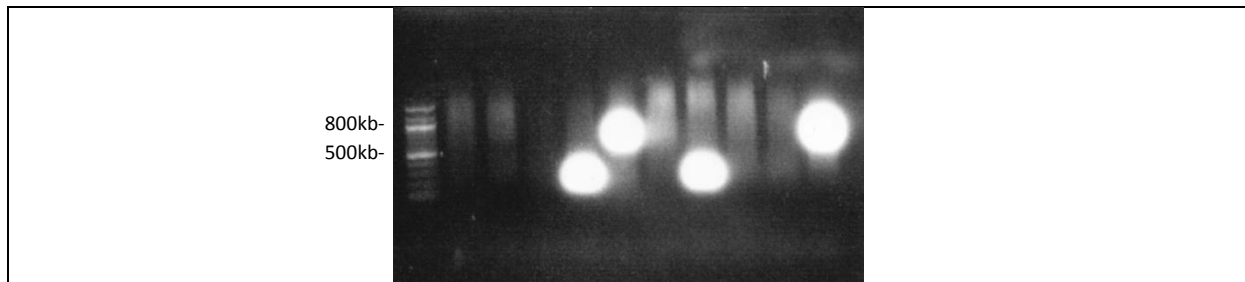


Abbildung 1: Gelbild einer Nicktranslation: Die Sonden-DNA in diesem Gelbild war zu lang, so dass ein DNase Nachverdau nötig war.

2.3.3.3. DNase 1-Verdau

Für optimale FISH-Ergebnisse wird ein DNase-Verdau bis zu einer Sondenlänge von 300-600bp durchgeführt.

Material

10x Nicktranslationspuffer (siehe Anhang);
DNase 1-Stocklösung (3mg/ml);

Methode

- Je 25µl PCR-Amplifikationsprodukt werden 5µl 10x NT-Puffer, DNase und 15µl Aqua bidest dazu gegeben.
- Der DNase-Verdau wird in einem 15°C kalten Wasserbad je nach Länge der amplifizierten DNA zwischen 10 Minuten und einer Stunde durchgeführt.
- Als Erfolgskontrolle dient erneut ein 1%-iges Agarosegel.

2.3.3.4. Ethanolfällung

Für die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung müssen die bereits markierten DNA-Proben sowie Chromosomenpräparate vorbereitet werden.

Sowohl die markierten Sonden als auch die DNA auf den Präparaten müssen einzelsträngig vorliegen, damit sich während der Hybridisierung die komplementären DNA-Stränge finden. Zur Volumeneinengung und zur Entfernung noch vorhandener freier Nukleotide wird entweder über Nacht bei -20°C oder für circa eine Stunde bei -80°C („Schnellfällung“) eine Ethanolfällung durchgeführt.

Material und Methoden

Salmon testes-DNA dient hierbei als Trägermaterial, Cot1-DNA zum Absättigen repetitiver Sequenzen zur Erhöhung der Spezifität der Hybridisierungssignale.

Die eingesetzten Mengen der jeweiligen Sonden sind Erfahrungswerte.

Material

Markierte DNA;

Cot-1 DNA (1mg/ml);

Salmon testes-DNA (10,4mg/ml);

Natriumacetat: NaOAc (3M, pH 5,2);

100% Ethanol;

Methode

Tabelle 15: Pipettieransatz

| DNA-Pool | Volumen (µl) | Cot1-DNA (µl) | Salmon testis (µl) | 3M NAOAc (1/10 Vol.)(µl) | 100% EtOH (x2,5 Vol.)(µl) |
|--------------|--------------|---------------|--------------------|-----------------------------|---------------------------|
| TR-Pool | 40 | 45 | 7,5 | 28 | 770 |
| BIO-Cy3-Pool | 40 | | | | |
| Dig-FITC | 40 | | | | |
| DEAC-Pool | 40 | | | | |

Bei den Mengenangaben für die eingesetzten Sonden des I-FISH-Mixes handelt es sich um ungefähre Angaben. Die einzusetzenden Mengen müssen nach jeder neuen Amplifikation ausgetestet werden.

- Der Mix wird über Nacht bei -20°C gefällt, um das Volumen zu vermindern und freie Nukleotide zu entfernen. Möglich ist auch eine Fällung bei -80°C in einer Stunde.
- Nach der Fällung wird der Mix 30 Minuten bei 4°C und 13.000rpm abzentrifugiert.
- Der Überstand wird abgenommen.
- Das Pellet wird mit 500µl 70% Ethanol (-20°C) 10 Minuten bei 13.000rpm gewaschen.
- Der Überstand wird abgenommen und das Pellet 5 Minuten bei 42°C getrocknet.

2.3.3.5. In-situ-Hybridisierung der Sonden

Material

Deionisiertes Formamid (pH 7);
40% Dextransulfat (siehe Anhang);
Fixogum;
Deckgläser 15mm x 15mm;

Methode

- Das luftgetrocknete Pellet wird in 16µl deionisiertem Formamid bei 42°C circa 25 Minuten im Vortexer gelöst.
- Wenn die DNA gelöst ist, gibt man 16µl 40% Dextransulfat dazu.
- Der Mix wird 7 Minuten bei 78°C im Heizblock denaturiert und 20 Minuten bei 42°C ohne Schütteln vorhybridisiert („preannealt“).
- 3µl des Hybridisierungsmixes werden auf ein vorbehandeltes Präparat aufgetragen und mit einem Deckglas und Fixogum luftdicht verschlossen.
- Die Hybridisierung erfolgt in einer Metallbox bei 37°C im Wasserbad über zwei Nächte.

2.3.3.6. Nachweis

Material

4x SSC-Lösung/ 0,2% Tween-20; 42°C (siehe Anhang);
1x SSC-Lösung; 60°C (siehe Anhang);
Block-Lösung: Glycin-BSA (siehe Anhang);
Antikörper für den Nachweis von Digoxigenin und Biotin:
- Sheep Anti-Dig-FITC, 1:100 verdünnt in 1% BSA;
- Strept-Avidin Cy3, 1:200 verdünnt in 1% BSA;
- DAPI (4,6-Diamidino-2-Phenylindol 2 HCl) (siehe Anhang);
Antifade: p-Phenylendiamindihydrochlorid-Lösung (siehe Anhang);
Deckgläser 24mm x 60mm;

Methode

- Fixogum mit Hilfe einer Pinzette vom Präparat entfernen. Das Präparat kurz in 37°C warmer 4x SSC-Lösung/ 0,2% Tween-20 eintauchen und das Deckglas vorsichtig herunterschieben.
- Das Präparat 3x 5 Minuten in 42°C warmer 4x SSC-Lösung/ 0,2% Tween-20 auf einem Inkubationsschüttler waschen.
- Anschließend 3x 5 Minuten in 60°C warmer 1x SSC-Lösung ebenfalls schüttelnd waschen.
- Präparat kurz in 4x SSC-Lösung/ 0,2% Tween-20 spülen und anschließend mit 1ml Glycin-BSA 25 Minuten bei 37°C in einer feuchten Kammer blocken.
- Nach dem Blocken das Präparat wieder kurz mit 4x SSC-Lösung/ 0,2% Tween-20 spülen (Entfernung der überschüssigen Block-Lösung).
- Antikörper-Stocklösung vor der Verdünnung für 2 Minuten bei 13.000rpm zentrifugieren, um Komplexbildungen zu vermeiden.
- 200µl verdünnte Antikörper-Lösung auf den Objektträger pipettieren:
Sheep Anti-Dig-FITC 1:200 in 1% BSA und Strept-Avidin Cy3 1:200 in 1% BSA.
- Den Objektträger mit einem Deckglas bedecken und 45 Minuten bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubieren.
- Objektträger 3x 5 Minuten in 42°C warmen 4x SSC-Lösung/ 0,2% Tween-20 schüttelnd waschen.
- 1ml DAPI-Lösung auf das Präparat (1µl DAPI in 20ml 4x SSC/ 0,2% Tween-20) aufbringen.
- Nach 3 Minuten Objektträger mit destilliertem Wasser gut abspülen und anschließend im Dunkeln lufttrocknen lassen.
- 35µl Antifade auf das Präparat pipettieren und mit einem Deckglas bedecken.

2.3.4. Mikroskopische Aufnahme

Die Fluorochrome werden nach der Hybridisierung mit einem motorisierten Epifluoreszenz-Mikroskop Leica DMRXA-RF8 (Leica Microsystems) aufgenommen (Eils et al. 1998). Dieses Mikroskop ist mit einem 8-Filter-Rad sowie hochspezifischen Filtern ausgestattet und in X-, Y- und Z-Richtung motorisiert. Jedes Fluorochrom kann mit einem separaten Anregungs-, Teilungs- und Emissionsfilter analysiert werden. Über eine AxioCam-MRm CCD-Kamera (charge coupled device) werden die Fluorochrome als skalierbare,

zweidimensionale Grauwertbilder aufgenommen, denen dann eine bestimmte Farbe zugeordnet wird.

Mikroskop und Kamera werden über eine Software (Leica QFISH, Leica Microsystems Imaging Solutions Ltd., Cambridge, UK) gesteuert. Durch Überlagerung der Einzelbilder (Farbkanäle) erhält man ein sogenanntes „true-colour“ Bild.

2.3.5. Statistische Auswertung

Pro Zelllinie wurden insgesamt mindestens 100 Kerne ausgewertet. Es wurde jeweils die Anzahl der Signale in jedem Kanal gezählt. Unterschieden wurden Zellkerne mit keinem, einem oder zwei Signalen pro Kanal. Kerne, bei denen in allen Kanälen zusammen mehr als drei und/oder vier Signale pro Kanal gezählt wurden, wurden als tri- bzw. tetraploid definiert. Um eine numerische Aberration als solche zu werten, musste sie in mindestens 30% der Kerne nachweisbar sein. Die Ergebnisse der I-FISH Untersuchung wurde in uni- und multivariaten Datenanalysen mit SPSS Vol. 18 (SPSS, Chigaco, IL) mit den anderen Prognosefaktoren verglichen.

2.4. Ermittlung zytogenetischer Aberrationen mittels Multiplex-Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (M-FISH)

Von September 2004 bis November 2005 wurden 134 Patientenproben aus den oben genannten Institutionen mit der M-FISH Methode auf zytogenetische Aberrationen untersucht. Die Untersuchung fand ebenfalls bei den meisten Patienten zum Zeitpunkt der Erstdiagnose statt.

2.4.1. Stimulation der CLL-Zellen mit CD40 Ligand (CD40L) und CpG-Oligodeoxynukleotiden (CpG-ODN) und Interleukin-2 (IL-2)

Die mononuklearen Zellen wurden, wie in 2.3.1. beschrieben, isoliert.

Die Metaphasen entstehen bei Teilung der Zellen. CLL-Zellen, die in Kultur gehalten werden teilen sich allerdings nicht spontan. Um die nötigen Metaphasen zu erhalten, stimulierten wir die CLL-Zellen mit CD40L oder einer Kombination aus CpG-ODN und IL-2.

2.4.1.1. Stimulation mit CD40L

Material

Ficoll Hypaque 1,077g/ml;
Peripheres Blut von 134 CLL-Patienten
CD40 Ligand exprimierende HeLa Zellen (bestrahlt mit 200Gy);
50U/ml Interleukin-4;
0,15µg/ml Colcemid;
Kammer-Platten;
Begaster Brutschrank mit 5% CO₂;

Methode

- Mononukleare Zellen wurden, wie in Punkt 2.3.1. beschrieben, mit einem Ficoll-Hypaque Schweregradienten isoliert.
- B-CLL-Zellen werden stimuliert.
- CD40 Ligand exprimierende HeLa Zellen, die zuvor kurzzeitig mit γ -Strahlen bestrahlt wurden, werden auf 6-Kammer-Platten aufgetragen und inkubieren über Nacht bei 37°C in einem mit 5% CO₂ begasten Brutschrank.
- Das Ganze wird zusammen mit Interleukin-4 (IL-4) für 72 Stunden inkubiert und danach mit Ficoll-Hypaque von den Feederzellen getrennt.
- Die Zellen werden gewaschen und mit 0,15µg/ml Colcemid behandelt. Colcemid ist ein Spindelgift mit dem die Zellen in der Metaphase arretiert werden.

2.4.1.2. Stimulation mit CpG-ODN und IL-2

Material

Ficoll Hypaque 1,077g/ml;
1µM CpG-ODN DSP30 (TCGTCGCTGTCTCCGCTTCTTCTTGCC);
50U/ml Interleukin-2;
0,15µg/ml Colcemid;
Peripheres Blut von 134 CLL Patienten;
Begaster Brutschrank mit 5% CO₂;

Methode

- Mononukleare Zellen wurden, wie in Punkt 2.3.1. beschrieben, mit einem Ficoll-Hypaque Schweregradienten isoliert.
- B-CLL Zellen werden stimuliert.

- Die CLL-Zellen werden zusammen mit 1µM CpG-ODN DSP30 und 50U/ml Interleukin-2 für 72 Stunden inkubiert.
- Die Zellen werden gewaschen und mit 0,15µg/ml Colcemid behandelt.

2.4.2. M-FISH spezifische Sonden

Für den 7-Fluorochrom-M-FISH-Pool (Azofeifa et al. 2000) wurden folgende Fluorochrome zur Markierung der DNA-Sonden verwendet.

In Klammern stehen jeweils die Wellenlängen der Anregungs- und Emissionsmaxima.

- 4,6-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI) (350nm/456nm)
- Spectrum Green (SG) (495nm/520nm)
- Cyanin-Farbstoff CY3 (554nm/568nm)
- Cyanin-Farbstoff CY3.5 (581nm/588nm)
- Cyanin-Farbstoff CY5 (652nm/672nm)
- Cyanin-Farbstoff CY5.5 (682nm/703nm)
- Diethylaminocoumarin (DEAC) (426nm/480nm)
- Avidin Laser Pro IR 790 (755nm/778nm)

Die Markierung der Proben erfolgte nach unten stehendem Schema:

| Name | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | X | Y | ps |
|--------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|---|---|----|
| Colour | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| SC8 | X | | | | | X | | | | X | | | X | | | X | | | | | | | X | | X |
| FITC | X | | | X | X | | X | | | | | | | | | | | X | X | | X | | | | |
| Cy3 | | | X | | | X | | X | | | X | | | | X | | | X | | X | | | | | |
| Cy3.5 | | | X | X | | | | | X | X | | | | | | | X | | | | | X | | X | X |
| Cy5 | | X | | | | | | | | | X | X | | X | X | X | X | | | | X | | | | |
| Cy5.5 | | X | | | | | X | | X | | X | | | X | | X | | | | | | | | | |
| Cy7 | | | | | X | | | X | | | X | | X | | | | | | | | | X | X | | X |

Abbildung 2: Schema der M-FISH-Probenmarkierung mit 7 Fluorochromen und zugehörigen Klassifizierungsfarben.

Der genaue Verlauf der Spektrallinien der Fluorochrome wird in Abbildung 3 dargestellt:

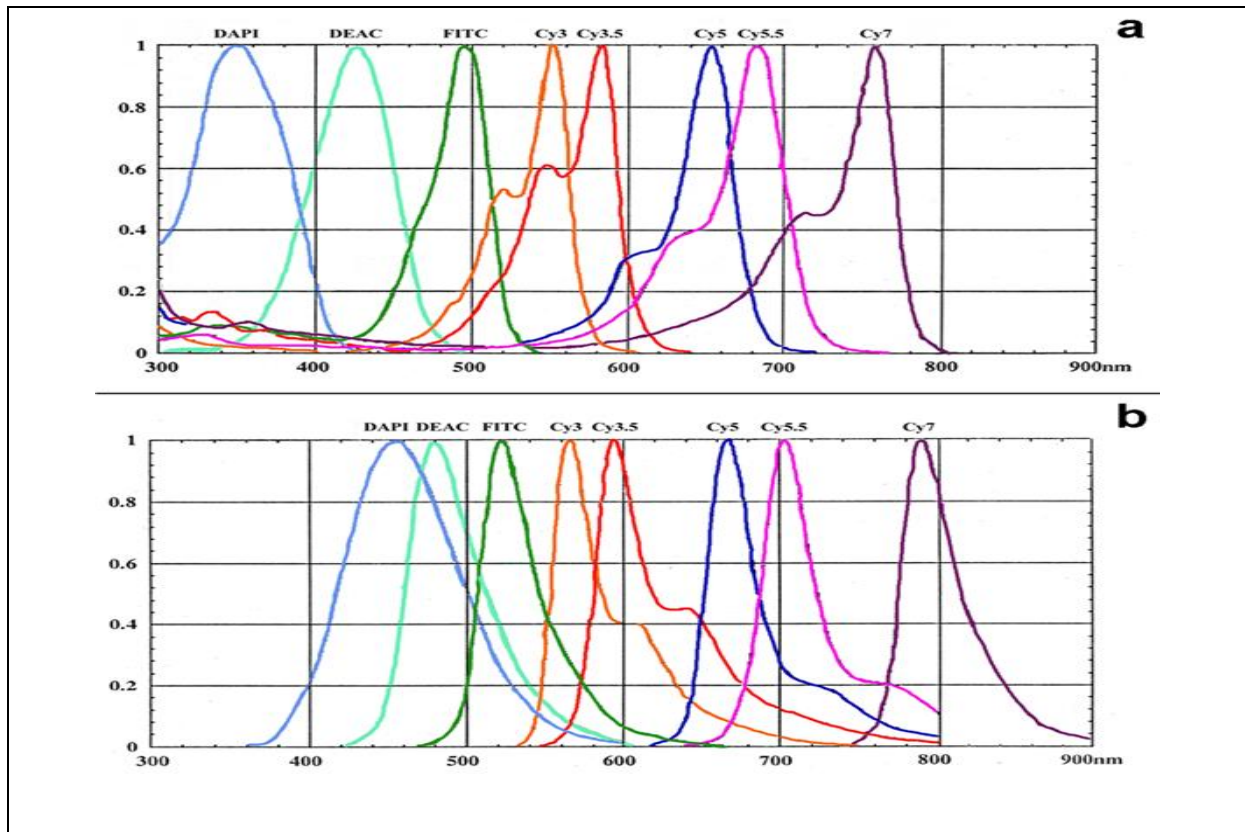


Abbildung 3: Anregungsspektren (a) und Emissionsspektren (b) der Fluorochrome

Die Abszisse beschreibt die Wellenlänge in nm. Auf der Ordinate sind die Anregungs- beziehungsweise Emissionsspektren mit einem Maximum bei 1 aufgetragen. Folgende Fluorochrome sind berücksichtigt:: DAPI, DEAC, FITC, CY3, CY3.5, CY5, CY5.5, CY7

2.4.2.1. Amplifikation der DNA-Sonden

Die Amplifikation der DNA-Pools wurde mittels DOP-PCR (degenerate oligonucleotide-primed-PCR nach Telenius et al. 1992) durchgeführt. Die DOP-PCR amplifiziert homogen die eingesetzte DNA durch Einsatz eines degenerierten Primers, der etwa alle 4kb an den DNA-Strang bindet.

Material

10x PCR-Puffer: 200mM Tris-HCl (pH 8,4) + 500mM KCl;
 50mM Magnesiumchlorid (MgCl₂);
 5mM dNTP's: aus dATP, dGTP, dTTP und dCTP; je 100mM; pH 7.5;
 6 MW-Primer (100μM): 5'-CCG ACT CGA GNN NNN NAT GTG G-3'
 Taq-Polymerase (5U/μl);
 PCR-Maschine;

Methode

Ansatz DOP-PCR

Tabelle 16: Ansatz der DOP-PCR

| | Ansatzkonzentration (1x) (µl) Mastermix | Endkonzentration (µl) Mastermix |
|---|---|---------------------------------|
| 10x PCR-Puffer | 2,5 | 1 |
| 50mM MgCl ₂ | 1 | 2 |
| 5mM dNTP's | 1 | 0,2 |
| 100µM 6 MW | 0,5 | 2 |
| Taq DNA Polymerase | 0,2 | 1 |
| ddH ₂ O | 18,8 | 1,25 |
| ⇒ je 24µl des Mastermix aus dem Röhrchen nehmen und 1µl DNA begeben | | |

Programm der DOP-PCR

Tabelle 17: Programm der DOP-PCR

| Schritt | Temperatur (°C) | Zeit (Minuten) |
|---------------------------|-----------------|----------------|
| 1. Anfangsdenaturierung | 94 | 3 |
| 2. Denaturierung | 94 | 1 |
| 3. Annealing | 56 | 1 |
| 4. Elongation | 72 | 4 |
| 5. Finale Elongation | 72 | 5 |
| ⇒ Schritte 1-4: 35 Zyklen | | |

Zur Kontrolle wird ein, wie bereits in Punkt 2.3.3.1 beschriebenes, Agarosegel angefertigt und der DOP-PCR Ansatz zur Kontrolle der Fragmentenlänge in die Geltaschen pipettiert. Die Banden werden mit dem Geltransilluminator sichtbar gemacht (Abbildung 4).

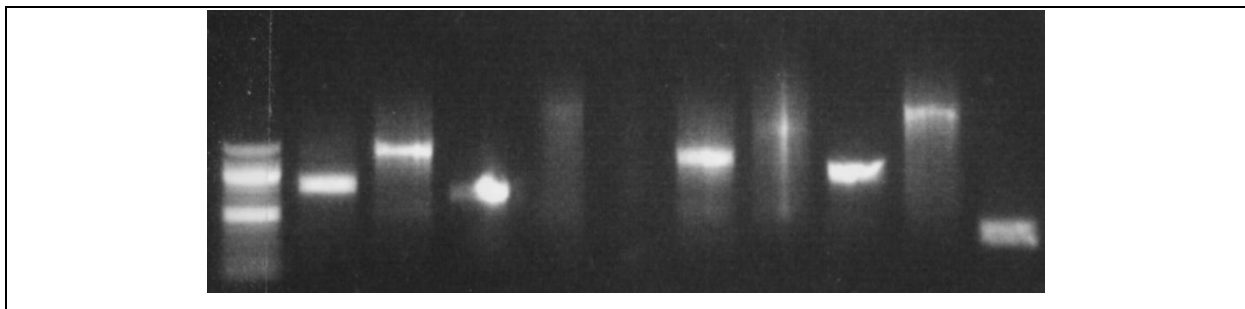


Abbildung 4: Gelbild einer DOP-PCR verschiedener Sonden

Die Sondenmarkierung wurde mit einer „Labeling-DOP-PCR“ (degenerate oligonucleotide-primed-PCR nach Telenius et al. 1992) durchgeführt (siehe oben). Während der PCR werden markierte Basenanaloga in die synthetisierten DNA-Stränge eingebaut.

Drei Pools werden direkt mit Fluorochromen (FITC, Cy3, Cy5, DEAC und Texas Red) und zwei mit Haptenen (Digoxigenin, Biotin) markiert.

Material

10x PCR-Puffer
 50mM Magnesiumchlorid (MgCl₂);
 5mM AGC aus dATP, dGTP, dCTP; je 100mM; pH 7.5;
 5mM AGT aus dATP, dGTP, dTTP; je 100mM; pH 7.5;
 5mM dTTP aus 100mM dTTP;
 5mM dCTP aus 100mM dCTP;
 6 MW-Primer (100µM): 5`-CCG ACT CGA GNN NNN NAT GTG G-3`;
 Taq-Polymerase (5U/µl);
 Biotin-16-dUTP (50nmol);
 Digoxigenin-11-dUTP (125nmol);
 FITC; FluorX-dCTP (25mM);
 Spectrum Green-dUTP (50nmol);
 Cy3-dUTP (25nmol);
 Cy5-dUTP (25nmol);
 DEAC (Diethylaminocoumarin)-5-dUTP (25nmol);
 Texas Red-12-dUTP (1mM);
 PCR-Maschine;

Methode

Die „Labeling-PCR“ wird nach folgenden Pipetierschemata angefertigt. Die Ansätze unterscheiden sich nach dem Verhältnis von markierten Basenanaloga zu unmarkierten Nukleotiden.

Ansatz Labelling-DOP-PCR für DEAC, Spectrum Green/ FITC, CY3, Texas Red, Biotin
 Molverhältnis von nicht markierten dTTPs zu markierten Thymidin-Basenanaloga 3:1

Tabelle 18: Ansatz der DOP-PCR für DEAC, Spektrum Green/ FITC, CY3, Texas Red, Biotin

| | Ansatzkonzentration (1x) (µl) Mastermix | Endkonzentration (µl) Mastermix |
|---|---|---------------------------------|
| 10x PCR-Puffer | 2,5 | 1 |
| 50mM MgCl ₂ | 1 | 2 |
| 5mM AGC | 1 | 0,2 |
| 5mM dTTP | 0,75 | 0,15 |
| 1mM Fluorochrom/ Hapten | 1,25 | 0,05 |
| 100µM 6 MW | 0,5 | 2 |
| Taq DNA Polymerase | 0,2 | 1 |
| ddH ₂ O | 16,8 | |
| ⇒ je 24µl des Mastermix aus dem Röhrchen nehmen und 1µl DNA begeben | | |

Ansatz Labelling-DOP-PCR für CY5 und Digoxigenin

Molverhältnis von nicht markierten dTTPs zu markierten Thymidin-Basenanaloga von 1:1

Tabelle 19: Ansatz der DOP-PCR für CY5 und Digoxigenin

| | Ansatzkonzentration (1x) (µl) Mastermix | Endkonzentration (µl) Mastermix |
|---|---|---------------------------------|
| 10x PCR-Puffer | 2,5 | 1 |
| 50mM MgCl ₂ | 1 | 2 |
| 5mM AGC | 1 | 0,2 |
| 5mM dTTP | 0,5 | 0,1 |
| 1mM Fluorochrom/ Hapten | 2,5 | 0,1 |
| 100µM 6 MW | 0,5 | 2 |
| Taq DNA Polymerase | 0,2 | 1 |
| ddH ₂ O | 15,8 | |
| ⇒ je 24µl des Mastermix aus dem Röhrchen nehmen und 1µl DNA begeben | | |

Ansatz Labelling-DOP-PCR für FITC

Molverhältnis von nicht markierten dCTPs zu markierten Cytidin-Basenanaloga von 1:1

Tabelle 20: Ansatz der DOP-PCR für FITC

| | Ansatzkonzentration (1x) (µl) Mastermix | Endkonzentration (µl) Mastermix |
|---|---|---------------------------------|
| 10x PCR-Puffer | 2,5 | 1 |
| 50mM MgCl ₂ | 1 | 2 |
| 5mM AGC | 1 | 0,2 |
| 5mM dCTP | 0,5 | 0,1 |
| 1mM FITC | 2,5 | 0,1 |
| 100µM 6 MW | 0,5 | 2 |
| Taq DNA Polymerase | 0,2 | 1 |
| ddH ₂ O | 15,8 | |
| ⇒ je 24µl des Mastermix aus dem Röhrchen nehmen und 1µl DNA begeben | | |

- 1%-iges Agarosegel als Erfolgskontrolle (siehe oben)
- Zeigt das Gelbild der PCR einen Schmier muss mit DNase verdaut werden, bis eine Fragmentlänge von 100-800bp erreicht ist.

2.4.2.2. Markierung der Sonden: Nicktranslation

Material

10x Nicktranslationspuffer (siehe Anhang);
 0,1M β -Mercaptoethanol;
 0,5mM AGC: aus dATP, dCTP, dGTP; je 100mM, pH 7,5;
 Digoxigenin-11-dUTP;
 Biotin-16-dUTP;
 Cy3-dUTP;
 Cy5-dUTP;
 Texas Red: Texas Red-12-dUTP, 1mM;
 DNA Polymerase 1, Kornberg-Enzym, 5U/ μ l;
 DNase 1 (1:10000 Verdünnung), Stocklösung 3mg/ml;

Methode

Nicktranslations-Ansatz

Tabelle 21: Nicktranslations-Ansatz für 50 μ l Volumen

| | Endkonzentration (1x) (μ l) Mastermix | Ansatzkonzentration (5x) (μ l) Mastermix |
|-------------------------------|--|---|
| 10x NT-Puffer | 5 | 25 |
| 0,1M β -Mercaptoethanol | 5 | 25 |
| 0,5mM AGC-Mix | 5 | 2,5 |
| Fluorochrom | 1 | - |
| Polymerase 1 | 1 | 5 |
| DNase 1 | 6 | - |
| ddH ₂ O | Add 50 | 79,5 |
| DNA | 1 | |

- Die Nicktranslation erfolgt bis zu 120 Minuten lang in einem 15°C Wasserbad. Nach dem Verdau sollte die DNA zwischen 100 und 800 Basenpaare (bp) lang sein.
- Zur Erfolgskontrolle je 5 μ l der nicktranslatierten Sonden auf ein 1%-iges Agarosegel auftragen. Falls die Sonden noch zu lang sind, ist ein DNase-Nachverdau notwendig.

2.4.2.3. DNase 1-Verdau

Für optimale FISH-Ergebnisse wird ein DNase 1-Verdau bis zu einer Sondenlänge von 100-800bp, wie in Punkt 2.3.3.3. beschrieben, durchgeführt.

2.4.2.4. Ethanolfällung

Die Ethanolfällung wird, wie in Punkt 2.3.3.4. beschrieben, durchgeführt. Auch hier sind die eingesetzten Mengen der jeweiligen markierten Sonden Erfahrungswerte.

Material

Markierte DNA
Cot-1 DNA (1mg/ml);
Salmon testes-DNA (10,4mg/ml);
Natriumacetat: NaOAc (3M; pH 5,2);
100% Ethanol;

Methode

Ansatz für 7-Fluorochrom-M-FISH

Tabelle 22: Ansatz der 7-Fluorochrom-M-FISH Ethanolfällung

| DNA-Pool | Volumen (µl) | Cot1- DNA (µl) | Salmon testis (µl) | 3M NaOAc (1/10 Vol.) (µl) | 100% EtOH (*2,5 Vol.) (µl) |
|---------------|--------------|----------------|--------------------|---------------------------|----------------------------|
| DEAC-Pool | 9 | je 30 | je 5 | je 9 | je240 |
| SPGreen-Pool | 9 | | | | |
| Cy3-Pool | 8 | | | | |
| TexasRed-Pool | 5 | | | | |
| Cy5-Pool | 8 | | | | |
| Dig-Pool | 6 | | | | |
| Bio-Pool | 7 | | | | |

- Das erhaltene Pellet wird circa 5 Minuten bei 42°C getrocknet.

2.4.2.5. Hybridisierungsmix und Hybridisierung

Material

Deionisiertes Formamid (pH 7);
40% Dextransulfat (siehe Anhang);
Fixogum;
Deckgläser 18mm x 18mm;

Methode

- Das luftgetrocknete Pellet wird, wie in Punkt 2.3.3.5. aufgeführt, weiterbehandelt. Wenn die DNA gelöst ist, gibt man 12µl 40% Dextransulfat dazu.
- 6µl des Hybridisierungsmixes werden auf ein vorbehandeltes Präparat wie folgt aufgetragen.

2.4.2.6. Vorbehandlung der Präparate

Die Vorbehandlung der Präparate erfolgt wie unter 2.3.2. bereits beschrieben.

- Auf die Chromosomenpräparate werden die bereits denaturierten und vorhybridisierten Sonden aufgetragen, mit einem Deckglas bedeckt und mit Fixogum abgedichtet.
- Die Hybridisierung erfolgt im Wasserbad bei 37°C über zwei Nächte.

2.4.2.7. Nachweis

Material

4x SSC/ 0,2% Tween-20, 42°C (siehe Anhang);
1x SSC, 60°C (siehe Anhang);
Block-Lösung: Glycin-BSA (siehe Anhang);
DAPI (4,6-Diamidino-2-Phenylindol 2 HCl) (siehe Anhang);
Antifade: p-Phenylendiamindihydrochlorid-Lösung (siehe Anhang);
Nachweis der indirekt markierten Proben:
- Sheep anti-Dig Cy5.5 (1mg/ml);
- Avidin-LaserPro790 (Cy7) (2mg/ml);
Deckgläser 24mm x 60mm;

Methode

- Der Nachweis wird, wie in Punkt 2.3.3.6 beschrieben, durchgeführt.
- Lediglich die Antikörper-Lösung unterscheidet sich hier: 200µl verdünnte Antikörper-Lösung auf den Objektträger pipettieren:
Sheep anti-Dig Cy5.5 1:100; Avidin-LaserPro 790 1:50.
- die Antikörperlösung wird in 1% BSA-Lösung verdünnt.
- Zum Schluss wird Antifade hinzugefügt und das Präparat mit einem Deckglas abgedeckt.

2.4.3. Epifluoreszenz-Mikroskopie und Bildanalyse

Zur Bildanalyse wird das bereits oben erwähnte Leica Mikroskop mit Kamera verwendet (siehe 2.3.4.). Die Klassifizierung der mit M-FISH hybridisierten Metaphasen erfolgte mit dem Leica Programm MCK (Eils et al. 1998) und wurde mit DAPI, FITC, CY-3, CY-5 und DEAC-Filtern durchgeführt.

2.4.4. Statistische Auswertung

Die Chromosomen wurden nach dem „International System for Human Cytogenetic Nomenclatur“ (ISCN) klassifiziert (Mitelman 1995).

Translokationen wurden als solche gewertet, wenn dieselbe Aberration in mindestens drei Metaphasen entdeckt wurde. Um die Anzahl der Aberrationen eines bestimmten Patienten abschätzen zu können, wurden Translokationen, interstitielle Deletionen und Inversionen nur als eine Aberration gewertet, auch wenn zwei Bruchpunkte beteiligt waren. Im Mittel wurden 20 Metaphasen pro Patient analysiert, wovon durchschnittlich zehn Metaphasen dieselbe Aberration zeigten.

2.5. Zusammenfassende Statistik

Der Endpunkt dieser Arbeit ist das TFS. Das TFS wurde als die Zeitspanne von der Erstdiagnose bis zum Beginn der First-line-Therapie bei zuvor unbehandelten Patienten festgelegt. Bei Patienten mit einer fortgeschrittenen Erkrankung wurde das TFS als Zeitspanne von der letzten Therapie bis zur erneuten Therapie bestimmt, so denn die zytogenetische Untersuchung in diesem therapiefreien Zeitraum durchgeführt wurde. Die TFS Zeiten wurden mittels Kaplan-Meier Kurven dargestellt und das 95% Konfidenzintervall (95% KI) für die proportionale Hazard Ratio in einer univariaten Datenanalyse ausgerechnet. Das proportionale Hazard Regressionsmodel von Cox wurde benutzt, um die Unterschiede im Hinblick auf das TFS und die prognostischen Faktoren in einer multivariaten Datenanalyse zu zeigen. Folgende Variablen wurden hierbei berücksichtigt: das Binet Stadium, das Vorkommen von komplex aberranten Karyotypen (drei oder mehr Aberrationen pro Sample), die CD38-Expression, die Deletion 17p- und das Vorkommen von Translokationen. Die Analyse wurde nach den unterschiedlichen Vorbehandlungen der Patienten geschichtet, da diese einen signifikanten Einfluss auf das TFS hatten.

Der gruppenweise Vergleich der Streuung der klinischen und laboratorischen Variablen zum Zeitpunkt der genetischen Analyse wurden mit dem Chi-Quadrat Test, dem 2-seitigen Kruskal-Wallis Test, dem Mann-Whitney-U Test, oder dem Fisher exact Test dargestellt. Ein Effekt wurde als statistisch signifikant eingeordnet wenn $P=0,05$ (5%) oder kleiner war. Die Berechnungen wurden mit dem Statistikprogramm SPSS Version 18 (SPSS, Chigaco, IL) durchgeführt.

3. Ergebnisse

Im Folgenden soll untersucht werden, ob der gleichzeitige Nachweis numerischer und struktureller zytogenetischer Aberrationen bei unbehandelten Patienten mit Hilfe einer M-FISH-Analyse eine sinnvolle Ergänzung der bekannten Prognoseparameter darstellen kann. Hierfür wurden die Ergebnisse der einzelnen Prognosefaktoren miteinander verglichen.

3.1. Auswertung der klinischen Daten, Laborparameter und des IgVH-Gen-Mutationsstatus

Um herauszufinden, ob unsere Patientengruppe repräsentativ für die Gruppe der CLL-Patienten ist, wurden zunächst die klinischen und laborchemischen Daten der Patienten analysiert und die jeweiligen Prognosefaktoren miteinander verglichen.

3.1.1. Einfluss der klinischen Daten auf den Verlauf der CLL

Es wurden insgesamt 146 Patienten in die Untersuchung eingeschlossen, davon waren 89 Männer (61%) und 53 Frauen (36%); bei vier Patientenproben (3%) lagen keine Angaben zum Geschlecht vor. Das Alter bei Diagnose der CLL lag zwischen 35-83 Jahren (Median 61 Jahre) und zum Zeitpunkt der zytologischen Untersuchung zwischen 41-86 Jahren (Median 66 Jahre). Die Patienten wurden zur Einteilung der Risikogruppen in zwei Gruppen unterteilt: Patienten <55 Jahren und Patienten >55 Jahren zum Zeitpunkt der Erstdiagnose.

24 Patienten (16%) waren zum Zeitpunkt der Diagnosestellung jünger als 55 Jahre. Zum Zeitpunkt der Erstdiagnose befanden sich 100 der Patienten (69%) im Binet Stadium A, 29 Patienten (20%) im Stadium B und ein Patient im Stadium C (<1%). Bei 16 Patienten (11%) fehlten die Angaben zum Zeitpunkt der Erstdiagnose. Zu Beginn der Untersuchungen waren 80 Patienten (55%) im Stadium A, 38 in Stadium B (26%) und 24 in Stadium C (16%). Bei vier Patienten (3%) fehlten die Angaben zum aktuellen Binet Stadium. 112 Patienten (77%) hatten vor der zytologischen Untersuchung noch nie eine Chemotherapie erhalten, 30 Patienten (20%) waren bereits vorthapiert. Bei vier Patienten (3%) war nicht bekannt, ob sie bereits eine Chemotherapie erhalten hatten. Bei den vorthapierten Patienten lag die Anzahl der Therapien zwischen ein bis 14 Therapiezyklen, wobei 80% der Patienten eine

Ergebnisse

Chemotherapie und 20% zwei oder mehr Therapien erhalten hatten. Die letzte Chemotherapie wurde mindestens drei Monate vor der Untersuchung verabreicht. Weniger als 1% aller Patienten erhielt eine Chemotherapie nach dem R-CHOP (Cyclophosphamid/ Vincristin/ Doxorubicin/ Prednisolon/ Rituximab) oder nach dem COP-Schema (Vincristin/ Prednisolon/ Cyclophosphamid), je 2% eine Therapie nach dem Knospe-Schema (Chlorambucil/ Prednisolon) oder mit FCR (Fludarabin/ Cyclophosphamid/ Rituximab). FC (Fludarabin/ Cyclophosphamid) wurde in 3%, Fludarabin Mono in 4% und Chlorambucil in 10% der Fälle verabreicht. Der Zeitraum von der Erstdiagnose der CLL bis zum Zeitpunkt der zytologischen Untersuchung lag im Mittel bei 55 Monaten (Median 31 Monate, Minimum 0 Monate, Maximum 540 Monate). Die Daten hinsichtlich des behandlungsfreien beziehungsweise progressionsfreien Überlebens [=treatment free survival (TFS), gemessen in Monaten] waren für 112 Patienten (77% der Patienten) verfügbar. Der Median des TFS lag bei 50 Monaten (Minimum 1 Monat, Maximum 542 Monate). Für das Gesamtüberleben [=overall survival (OS), gemessen in Monaten] lagen Daten von 118 Patienten (81% der Patienten) vor. Hier lag der Median bei 76 Monaten (Minimum 16 Monate, Maximum 572 Monate). Während der Zeit der Nachbeobachtung bis ins Frühjahr 2008 erhielten 79 Patienten (54%) eine Chemotherapie oder zeigten einen klinischen Progress, nur 23 der 146 Patienten (16%) verstarben. Aufgrund der niedrigen Todeszahlen in unserem Beobachtungszeitraum ist das Gesamtüberleben als Zielwert nicht repräsentativ und wird deshalb im Folgenden nicht aufgeführt. Dies liegt daran, dass ein Großteil der Patienten kurz nach Erstdiagnose in die Untersuchung aufgenommen wurde, um viele nicht therapierte Patienten zu untersuchen. Bei einer längeren Beobachtung geht man von einem signifikanten Unterschied aus. Die Prognose der einzelnen Faktoren bezieht sich deshalb nur auf das TFS. Hier zeigten sich folgende Ergebnisse: Patienten mit männlichem Geschlecht, in einem fortgeschrittenen Binet Stadium oder Solche, die bereits eine oder mehrere Chemotherapien erhalten haben, zeigten erwartungsgemäß eine signifikant schlechtere Prognose bezüglich des TFS. Das Alter bei Erstdiagnose machte keinen signifikanten Unterschied aus.

Tabelle 23: Univariate Datenanalyse: Zusammenfassende Darstellung der klinischen Daten in Bezug auf das TFS in Monaten.

| Prognosefaktor für das TFS | Median des TFS bei positivem Testergebnis | Anzahl der Patienten | Median des TFS bei negativem Testergebnis | Anzahl der Patienten | P | Signifikanz |
|----------------------------|---|----------------------|---|----------------------|---------|-------------|
| Männer | 54 (32-75) | 68 (63%) | 92 (71-113) | 40 (37%) | 0,049 | signifikant |
| Alter bei ED <55J | 92 (27-157) | 24 (22%) | 80 (53-108) | 86 (78%) | 0,457 | n.s. |
| Binet Stadium | | | | | <0,0001 | signifikant |
| A | 85 (73-97) | 81 (78%) | | | | |
| B | 33 (10-56) | 22 (21%) | | | | |
| C | 1 | 1 (1%) | | | | |
| Chemotherapien | | | | | <0,0001 | signifikant |
| 0 CTx erhalten | | 47 (42%) | | | | |
| 1 CTx erhalten | | 58 (52%) | | | | |
| 2 CTx erhalten | | 2 (2%) | | | | |
| ≥ 3 CTx erhalten | | 4 (4%) | | | | |

n.s.=Nicht signifikant; N=112

3.1.2. Einfluss der Laborparameter und des IgVH-Gen-Mutationsstatus auf den klinischen Verlauf der CLL

Die Bestimmung der jeweiligen Parameter wurde extern von den jeweiligen behandelnden Ärzten zeitnah zum Zeitpunkt der zytologischen Untersuchung veranlasst und konnte nicht bei allen Patienten erhoben werden. Zum Untersuchungszeitpunkt lagen die Lymphozytenwerte von 129 (88% aller Patienten), die Werte der Leukozyten, Thrombozyten und des Hämoglobinwert von 138 (95% des Gesamtkollektives) der 146 Patienten vor. Somit konnte, in Zusammenschau der Befunde der körperlichen Untersuchung, die Einteilung in die aktuellen Binet Stadien bei nahezu allen Patienten erfolgen. Bei 40 Patienten lagen die LDH-Werte zum Zeitpunkt der Untersuchung vor (27% des Gesamtpatientenkollektivs). Bei Patienten mit erhöhten LDH-Werten konnte zwar ein kürzeres TFS errechnet werden, es zeigt sich jedoch kein direkter Zusammenhang mit anderen Prognosefaktoren. Bei 76 Patienten wurde der Beta-2-Mikroglobulinspiegel (β -2-M-Spiegel; 52% aller Patienten), bei 60 Patienten (41% des Patientenkollektivs) wurde der Serum-Thymidinkinasespiegel (TK-Spiegel) bestimmt. Bei 40 Patienten (27% des Patientenkollektivs) wurden die IgVH-Gene bestimmt. Alle Laborparameter zeigten bei Erstdiagnose kein spezifisches Verteilungsmuster in den unterschiedlichen Binet Stadien. Bei Patienten mit erhöhten β -2-M-Spiegel ($P=0,009$) und bei Patienten mit unmutierten IgVH Genen ($P=0,002$) zeigte sich ein schneller Progress in ein höheres Binet Stadium. Erhöhte TK-Spiegel und unmutierte IgVH-Gene fanden sich signifikant häufiger bei Männern. Von 29 der 146 Patienten lag zum Untersuchungszeitpunkt der ZAP-70-Expressionsstatus vor (20% des Gesamtpatientenkollektivs). Da nur bei zwei dieser Patienten ein Progress vorlag können keine signifikanten Aussagen gemacht werden.

Anhand der erhobenen klinischen und laborchemischen Daten stellt sich unsere Patientengruppe als repräsentativ für CLL-Patienten dar. Die bereits etablierten Prognosefaktoren zeigten erwartungsgemäß einen signifikanten Unterschied bezüglich des TFS und sollen im Weiteren mit den neuen Prognosefaktoren verglichen werden.

Ergebnisse

Tabelle 24: Univariate Datenanalyse: LDH-Erhöhung, β -2-M-Erhöhung, TK-Spiegel, IgVH-Mutationsstatus, ZAP-70-Expressionsstatus vs. TFS in Monaten.

| Prognosefaktor für das TFS | Median des TFS bei positivem Testergebnis | Anzahl der Patienten | Median des TFS bei negativem Testergebnis | Anzahl der Patienten | P | Signifikanz |
|----------------------------|---|----------------------|---|----------------------|--------|-------------|
| LDH >248U/l | 59 (0-140) | 4 (11%) | 100 (58-142) | 31 (89%) | 0,047 | signifikant |
| β -2-M >3,5mg/l | 50 (0-101) | 17 (22%) | 85 (47-123) | 59 (78%) | 0,415 | n.s. |
| TK>10U/l | 54 (41-67) | 24 (51%) | 542 (NC) | 23 (49%) | 0,001 | signifikant |
| IgVH unmutiert | 16 (0-40) | 18 (45%) | 92 (8-176) | 22 (55%) | 0,0001 | signifikant |
| ZAP-70 positiv | NC | 2 (7%) | NC | 27 (93%) | 0,388 | n.s. |

NC=Not calculated: Das 95% KI wurde aufgrund der Anzahl zensierter Fälle nicht errechnet. n.s.=nicht signifikant

3.2. Statistische Auswertung der Immunphänotypisierung: CD38-Expression

Bei 133 Patienten (91% aller Patienten) konnte der Oberflächenmarker CD38 mit FACS gemessen werden. Waren bei CD19 positiven Zellen mehr als 30% der Zellen zugleich CD38 positiv, wurde die Probe als CD38 positiv gewertet (Damle et al. 1999).

CD38 positive Patienten hatten ein signifikant kürzeres TFS und waren klinisch deutlich progredient. Dies zeigte sich im Wechsel des Binet Stadiums. Zum Zeitpunkt der Erstdiagnose waren 50% der CD38 positiven Patienten im Binet Stadium A, 45% im Binet Stadium B und 5% im Binet Stadium C (P=0,002). Nach einer Beobachtungszeit von durchschnittlich 33 Monaten zeigte sich für die CD38 positiven Patienten ein deutlicher Progress hinsichtlich des Binet Stadiums: In Stadium A befanden sich nur noch 23% der Patienten, 54% in Stadium B und 23% in Stadium C (P=0,001). Die CD38 negativen Patienten hingegen waren zum Zeitpunkt der Erstdiagnose wie folgt verteilt: 81% Binet Stadium A, 19% Binet Stadium B und keiner im Binet Stadium C. Bei Kontrolle im Frühjahr 2008 waren von ihnen 63% im Binet Stadium A, 21% im Binet Stadium B und 16% im Binet Stadium C.

Im Vergleich zu CD38 negativen Patienten hatten CD38 positive Patienten klinisch einen rascheren Progress (P=0,001) und ein signifikant kürzeres TFS (P=0,002). Diese Daten lagen für insgesamt 124 Patienten vor.

Patienten mit positiver CD38-Expression erhielten signifikant häufiger eine Chemotherapie als CD38 negative Patienten (P<0,001).

Die Geschlechter waren in beiden CD38-Gruppen gleich verteilt (P=0,462).

Ergebnisse

Tabelle 25: Univariate Datenanalyse: CD38-Expression vs. TFS in Monaten.

| Prognosefaktor für das TFS | Median des TFS bei positivem Testergebnis | Anzahl der Patienten | Median des TFS bei negativem Testergebnis | Anzahl der Patienten | P | Signifikanz |
|----------------------------|---|----------------------|---|----------------------|-------|-------------|
| CD38 positiv | 38 (18-59) | 17 (17%) | 84 (61-107) | 86 (83%) | 0.002 | signifikant |

N=124

Tabelle 26: Progress nach CD38-Status

| CD38-Status | Binet Stadium bei Erstdiagnose | | | Binet Stadium im Verlauf | | |
|--------------|--------------------------------|----------|--------|--------------------------|----------|----------|
| | A | B | C | A | B | C |
| CD38 negativ | 84 (81%) | 20 (19%) | 0 | 69 (63%) | 23 (21%) | 18 (16%) |
| CD38 positiv | 10 (50%) | 9 (45%) | 1 (5%) | 5 (23%) | 12 (54%) | 5 (23%) |

N=124

3.3. Auswertung der I-FISH Untersuchung

3.3.1. Statistische Auswertung

Die I-FISH Untersuchung wurde bei 132 Patienten durchgeführt. Bei 65 Patienten (49%) wurde die zytogenetische Untersuchung zum Zeitpunkt der Erstdiagnose durchgeführt. 104 Patienten (79%) hatten zuvor noch nie eine Chemotherapie erhalten. Untersucht wurden die Proben auf Deletionen an den Genloki 6q21, 11q22-q23, 13q14, 17p13 und das Vorkommen einer Trisomie 12, wobei in 93 Fällen (71%) Abnormitäten festgestellt wurden. Als Abnormität wurde gezählt, wenn mindestens 30% der ausgezählten Zellen nur einen oder keinen Genlokus aufzeigten, oder eine Trisomie vorlag (Döhner et al. 1997; Hamblin et al. 1997). Außer der Deletion 13q- waren alle Deletionen monoallelisch. Die Deletion 13q- trat monoallelisch und biallelisch auf.

Eine Deletion 6q- trat signifikant häufiger bei unbehandelten Patienten auf (P=0,009).

Bei den anderen untersuchten Aberrationen und dem Vorkommen eines normalen Chromosomensatzes zeigte sich kein Unterschied zwischen vorththerapierten und nichttherapierten Patienten.

Bei Patienten mit einem normalen Karyotypen kam es im Beobachtungszeitraum von 33 Monaten signifikant seltener zu einem klinischen Progress (P=0,033), der sich in einem Wechsel in ein höheres Binet Stadium ausdrückte. Patienten mit einer Deletion 17p- wechselten in dieser Zeit häufiger in das Stadium Binet B oder C. (P=0,077). Die Daten lagen von 122 Patienten vor.

Ergebnisse

Tabelle 27: Vorkommen von Aberrationen

| I-FISH | |
|--------------------------|--------------------|
| Anzahl der Aberration | Häufigkeit |
| 1 Aberration | 48 Patienten (36%) |
| 2 Aberrationen | 32 Patienten (24%) |
| 3 Aberrationen | 9 Patienten (7%) |
| 4 Aberrationen | 4 Patienten (3%) |
| Normaler Chromosomensatz | 41 Patienten (30%) |
| Art der Aberration | |
| Del 6q- | 35 Patienten (27%) |
| Del 11q- | 22 Patienten (17%) |
| Del 13q- monoallelisch | 48 Patienten (36%) |
| Del 13q- biallelisch | 10 Patienten (8%) |
| Del 17p- | 19 Patienten (15%) |
| Trisomie 12 | 14 Patienten (11%) |

N=132

Tabelle 28: Univariate Datenanalyse: Gesamtvergleich der Aberrationen im I-FISH vs. TFS in Monaten

| Prognosefaktor für das TFS | Median des TFS bei Aberration | Anzahl der Patienten | Median des TFS bei normalem Karyotyp | Anzahl der Patienten | P | Signifikanz |
|----------------------------|-------------------------------|----------------------|--------------------------------------|----------------------|---------|-------------|
| Del 6q- | 53 (0-107) | 25 (47%) | NR | 28 (53%) | 0,009 | Signifikant |
| Del 11q- | 38 (36-40) | 18 (40%) | NR | 27 (60%) | <0,0001 | Signifikant |
| Del 13q- mono | 80 (49-111) | 45 (65%) | NR | 26 (35%) | 0,019 | Signifikant |
| Del 17p- | 38 (20-56) | 15 (36%) | 135 | 27 (64%) | 0,001 | Signifikant |
| Trisomie 12 | 55 (23-87) | 6 (19%) | NR | 26 (81%) | 0,044 | Signifikant |

NR=Not reached. TFS bis zum Abschluss der Untersuchung nicht erreicht.

N=123

Tabelle 29: Progress nach Art der Aberration im Vergleich zu Patienten mit normalem Karyotyp im I-FISH

| Aberration | Binet Stadium bei Erstdiagnose | | | Binet Stadium im Verlauf | | |
|------------------------|--------------------------------|---------|--------|--------------------------|----------|----------|
| | A | B | C | A | B | C |
| Del 6q- | 26 (84%) | 5 (16%) | 0 | 17 (48%) | 9 (26%) | 9 (26%) |
| Del 11q- | 17 (81%) | 4 (19%) | 0 | 11 (50%) | 9 (41%) | 2 (9%) |
| Del 13q- mono | 36 (84%) | 6 (14%) | 1 (2%) | 24 (50%) | 13 (27%) | 11 (23%) |
| Del 13q- bi | 8 (80%) | 2 (20%) | 0 | 5 (50%) | 4 (40%) | 1 (10%) |
| Del 17p- | 12 (75%) | 4 (25%) | 0 | 7 (36%) | 6 (32%) | 6 (32%) |
| Trisomie12 | 11 (85%) | 2 (15%) | 0 | 9 (69%) | 4 (31%) | 0 |
| Karyotyp normal | 31 (77%) | 9 (23%) | 0 | 30 (76%) | 5 (12%) | 5 (12%) |

N=132

Im Gesamtvergleich der zytogenetischen Untergruppen im I-FISH zeigte sich erwartungsgemäß ein signifikant kürzeres TFS für Patienten mit einer Deletion 11q- und Deletion 17p- im Vergleich zur Gesamtpopulation (TFS der Gesamtpopulation: Median 50

Ergebnisse

Monate). Ein signifikant längeres TFS wurde bei Patienten mit einer monoallelischen Deletion 13q- gefunden. Diese Patienten haben eine signifikant bessere Prognose als die Gesamtpopulation.

Patienten mit einer Deletion 6q- oder 13q- mono und einer zusätzlichen Deletion 11q- oder 17p- verschlechterten sich in ihrer Prognose des TFS signifikant.

Zusammenfassend lassen sich die Patienten in drei Prognosegruppen unterteilen. Patienten mit einem normalen Chromosomensatz und einer monoallelischen Deletion 13q- haben eine gute Prognose, Patienten mit einer Deletion 6q- oder Trisomie 12 haben eine mittlere Prognose und Patienten mit einer Deletion 11q- oder 17p- haben eine schlechte Prognose.

Tabelle 30: Prognose der einzelnen Aberrationen bezüglich des TFS.

| Gute Prognose | Mittlere Prognose | Schlechte Prognose |
|---|-------------------|--------------------|
| Normaler Chromosomensatz | Del 6q- | Del 11q- |
| Del 13q- mono | Trisomie 12 | Del 17p- |
| => Eine zusätzliche Deletion 11q- oder 17p- verschlechtert die Prognose | | |

Ergebnisse

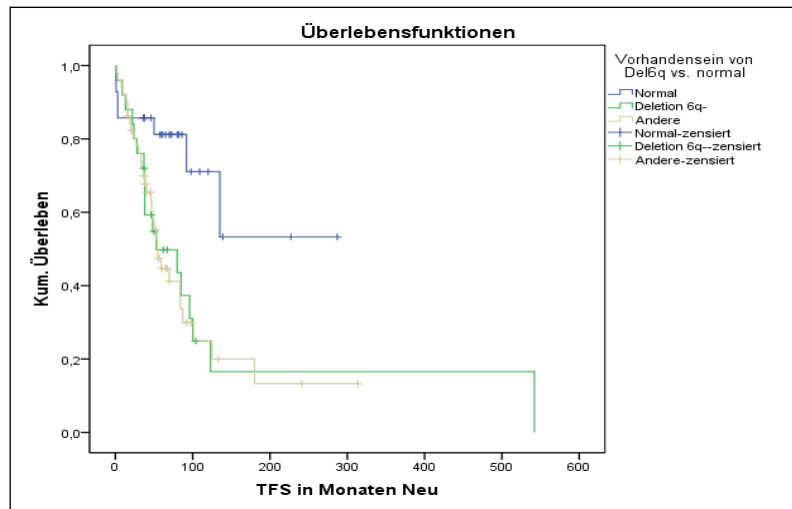


Abbildung 6: Überlebensfunktion nach Kaplan-Meier:

TFS von Patienten mit oder ohne eine Deletion 6q-. N=104.

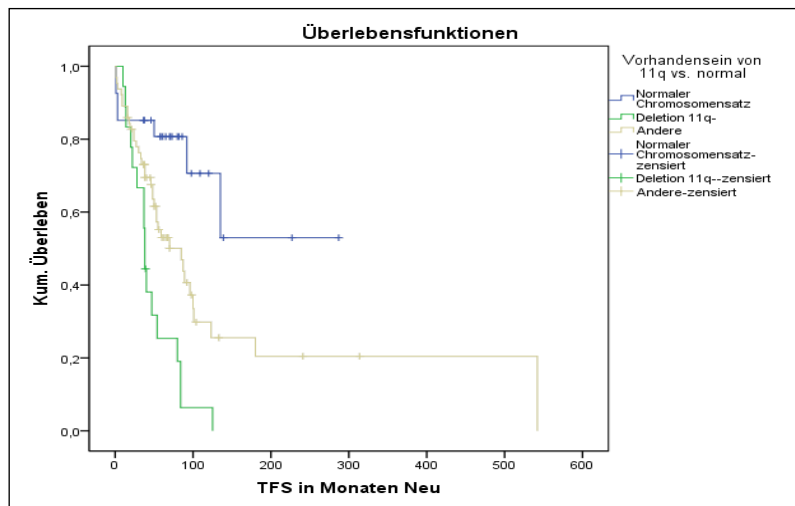


Abbildung 7: Überlebensfunktion nach Kaplan-Meier:

TFS von Patienten mit oder ohne Deletion 11q-. N=109.

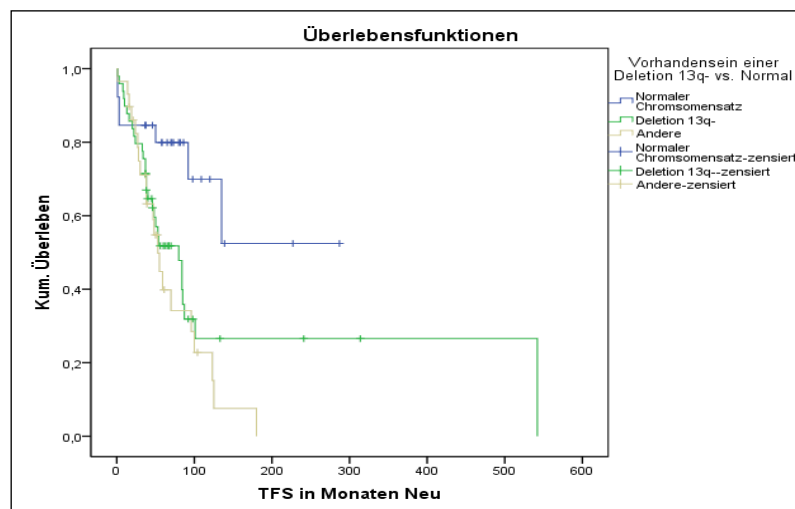


Abbildung 8: Überlebensfunktion nach Kaplan-Meier:

TFS von Patienten mit oder ohne eine Deletion 13q- mono. N=104.

Ergebnisse

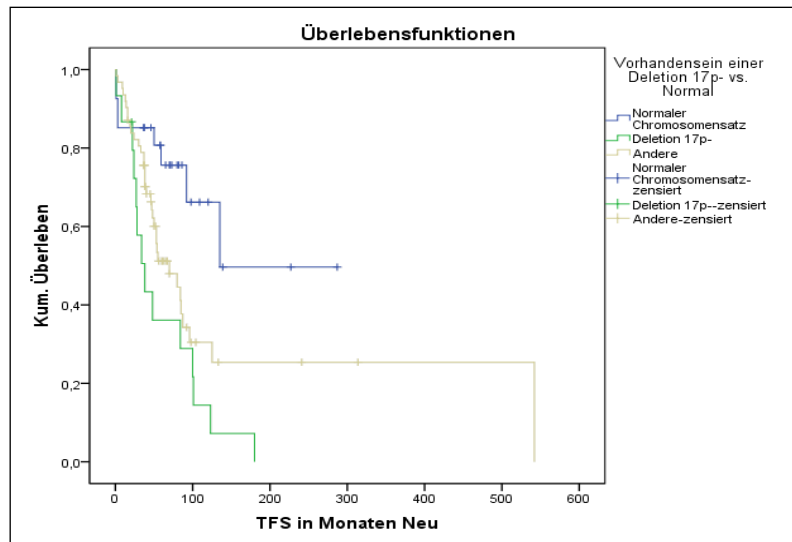


Abbildung 9: Überlebensfunktion nach Kaplan-Meier:

TFS von Patienten mit oder ohne eine Deletion 17p-. N=104.

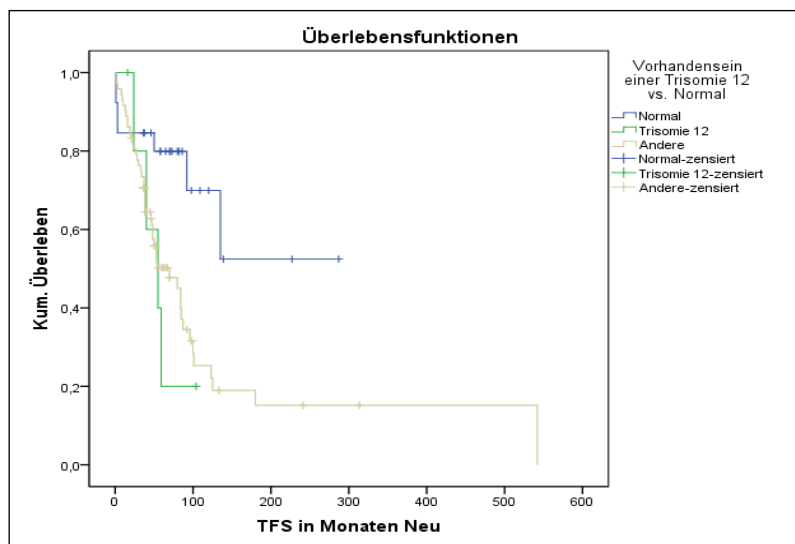
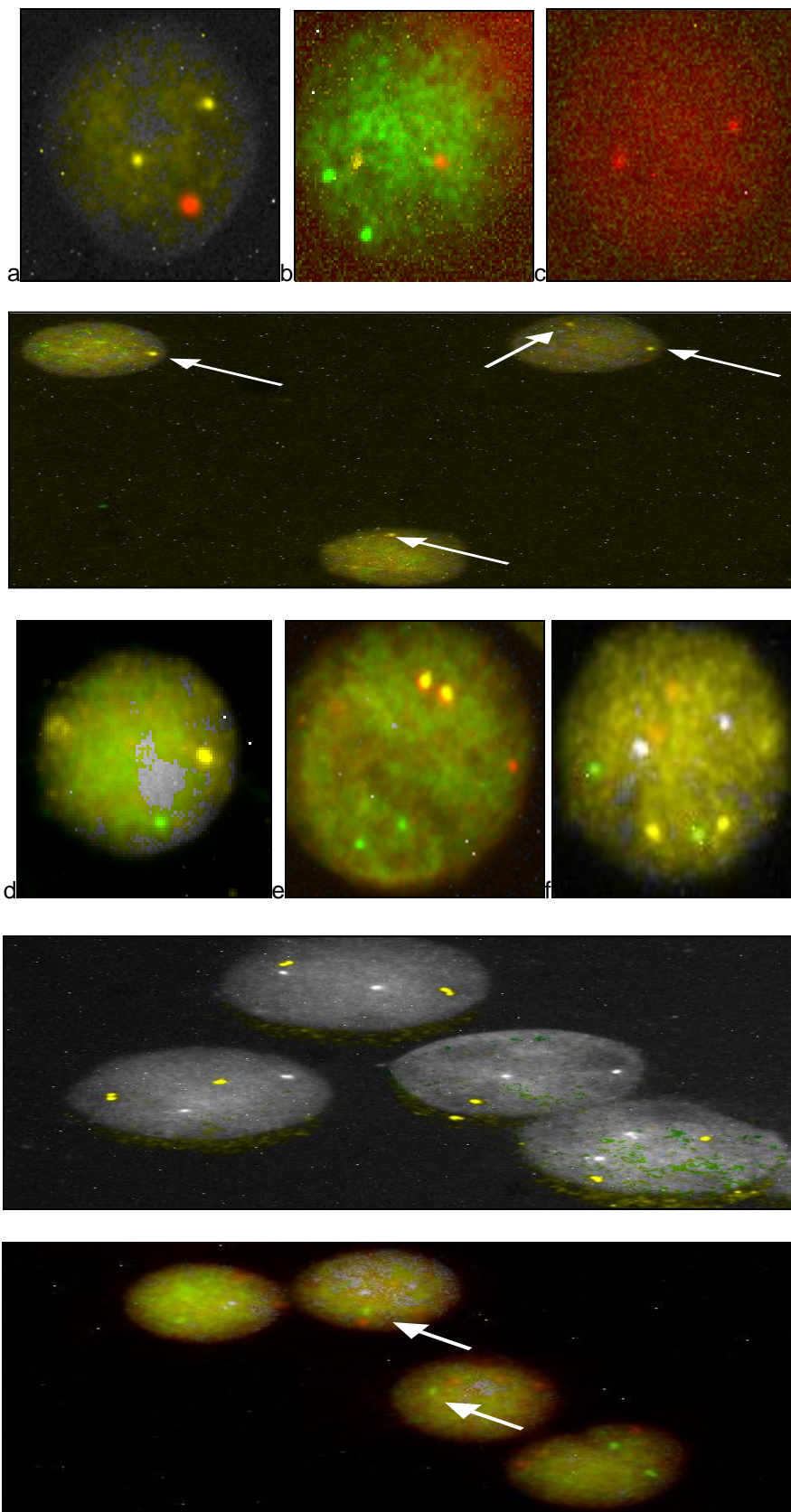


Abbildung 10: Überlebensfunktion nach Kaplan-Meier:

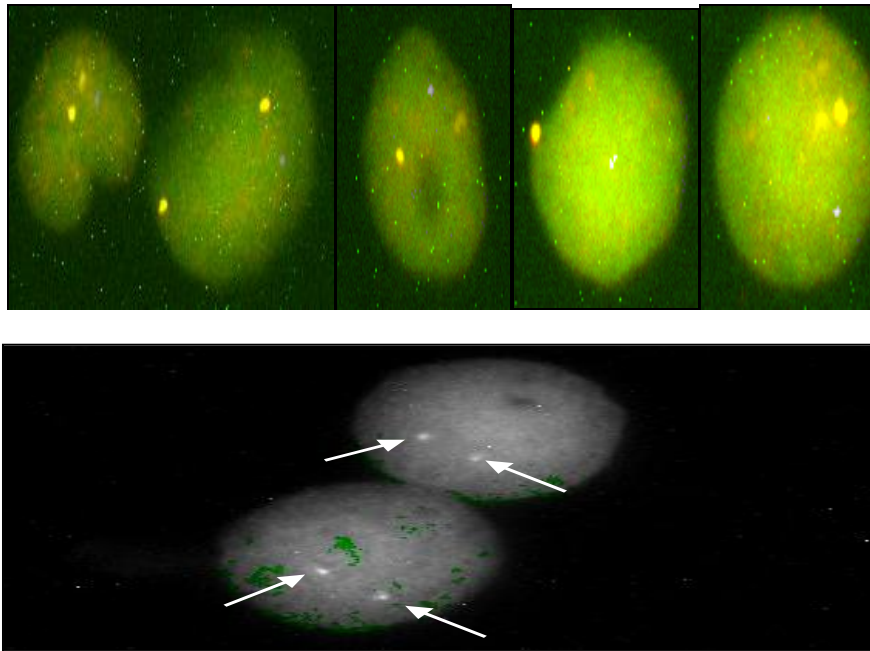
TFS von Patienten mit oder ohne eine Trisomie 12. N=104.

3.3.2. Bilder

Im Folgenden werden Beispielbilder der unterschiedlichen Aberrationen gezeigt.



Ergebnisse



Fotos Zeile 1-7: I-FISH

- Zeile 1: a.-b.) Sonde-Fluorochrombilder mit einer Deletion 6q21 (rotes Signal). Normalbild 11q22-23 (gelbes Signal) und Normalbild 13q14 (grünes Signal) dienen als Kontrolle. c.) Normalbild 6q21.
- Zeile 2: Sonde-Fluorochrombild mit einer Deletion 11q22-23 (gelbes Signal).
- Zeile 3: a.) Sonde-Fluorochrombild mit einer Deletion 11q22-23 (gelbes Signal) und Deletion 13q14 (grünes Signal, dient zur Kontrolle). b.) Normalbild 11q22-23 und 13q14. c.) zusätzlich Normalbild 6q21 (rotes Signal) und 17p13 (weißes Signal).
- Zeile 4: Sonde-Fluorochrombild mit einem Normalbild für 11q22-23 (gelbes Signal). Die Darstellung von 17p13 (weißes Signal) dient zur Kontrolle.
- Zeile 5: Sonde-Fluorochrombild mit einer monoallelischen Deletion 13q14 (grünes Signal). Zusätzlich Normalbild 6q21 (rotes Signal) zur Kontrolle.
- Zeile 6: Sonde-Fluorochrombilder mit einer Deletion 17p13 (weißes Signal) zusätzlich Normalbild für 11q22-23 (gelbes Signal).
- Zeile 7: Sonde-Fluorochrombild mit einem Normalbild für 17p13 (weißes Signal).

3.4. Auswertung der M-FISH Untersuchung

3.4.1. Statistische Auswertung

Von insgesamt 146 Patienten lag bei 134 Patienten (92%) genügend Material vor, um eine Metaphaseuntersuchung durchzuführen. Nach der Stimulation der CLL-Zellen mit CD40L beziehungsweise CpG-ODN konnten bei allen 134 Patienten Metaphasen gefunden werden. Die Metaphasen wurden auf das Vorkommen von numerischen und strukturellen Veränderungen mit M-FISH untersucht. Im Mittel wurden 20 Metaphasen untersucht, wovon durchschnittlich zehn Metaphasen dieselbe Aberration zeigten. Eine Aberration wurde als solche gewertet, wenn sie in mindestens drei Metaphasen gefunden werden konnte. Die Karyotypen der untersuchten Patienten sind in Tabelle 31 dargestellt.

Ergebnisse

Tabelle 31: Karyotypen der 134 mit M-FISH untersuchten Patienten

| Patient | ISCN-Nomenklatur |
|---------|--|
| 01 | 46, XX, (13/13): normal |
| 02 | 46, XY, (3/4): del(13)(q14); (1/4): normal |
| 03 | 46, XX, (12/12): del(13)(q14), (5/12): del(11)(q23) |
| 04 | 46, XX, (14/14): normal |
| 05 | 46, XY, (8/19): del(5)(p), t(10;18)(q22;p11), der(1)t(1;1)(p;q32), der(17)(1;13;17)(q32;?:p12); (1/19): del(5)(p); (1/19): del(5)(p), t(10;18); (1/19): del(5)(p), t(10;18), der(13)t(1;13); (1/19): del(5)(p), t(9;13)(q21;q14); (1/19): del(5)(p), der(18)t(13;18), der(4)t(4;13), del(11)(q13-q23) |
| 06 | 46, XY, (10/10): normal |
| 07 | 46, XX, (10/10): del(11)(q13) |
| 08 | 46, XX, (7/8): del(11)(q13-q23); (3/8): del(13)(q14); (2/8): del(9)(q); (2/8): del(X)(q); (1/8): del(3)(p) |
| 09 | 46, XY, (12/12): normal |
| 10 | 46, XY, (9/9): t(14;18)(q32;q21) |
| 11 | 46, XY, (10/10): +12; (8/10): +19; (5/8): +18; (8/13): der(7)t(7;11)(p21;p oder q) |
| 12 | 46, XY, (4/9): t(10;13)(q21;q14); (5/9): normal |
| 13 | 46, XY, (1/25): t(6;13); (1/25): del(6)(q); (9/10): del(11)(q13-q23); (4/6): del(2)(q24-q33); (10/25): normal |
| 14 | 46, XY, (14/14): del(13)(q14) |
| 15 | 46, XX, (14/14): t(3;13)(p12;q14) |
| 16 | 46, XY, (7/7): del(13)(q14) |
| 17 | 46, XX, (26/26): t(13;22)(q14odq21;q11odq12), der(17;18)(q10;q10); (1/26): t(16;17)(q11;q12), der(17)t(9;17)(q22;q12) |
| 18 | 46, XX, (1/5): t(13;22), t(2;4)(q21;q22), del(3)(q); (4/5): normal |
| 19 | 46, XX, (9/9): del(11)(q13), del(13)(q14), i(12)(q), i(12)(p) |
| 20 | 46, XY, (4/15): del(13)(q14); (11/15): normal |
| 21 | 46, XX, (1/6): der(11)t(4;11)(q11;p13); (1/6): der(11)t(4;11)(q11;p13), der(18)t(3;18); (1/6): der(11)t(4;11)(q11;p13), der(18)t(3;18)(?;q21), der(8)ins(8;15)(p12;q?); (1/6): t(20;22) reziprok; (1/6): der(13)t(4;13); (1/6): 41,XX, -3, -4, -9, -15, -19, der(8)ins(8;15)(p12;q?q?), der(11)t(4;11)(q11;p13), del(13)(q14), der(18)t(3;18)(?;q21), ins(11;13)(q12;q21q34) |
| 22 | 46, XY, (5/29): der(8)t(2;8)(p?;p12); (1/29): t(3;15); (1/29): t(2;13); (5/5): del(11)(q14-q23), del(13)(q14); (22/29): normal |
| 23 | 46, XX, (12/12): der(17;18)(q10;q10), t(3;13)(p22;q14), t(3;14)(p22;q32), t(8;15)(21.3;q15), t(13;16)(q14,q13), t(8;20), t(4;6)(?;q15), t(1;4)(p33;?), t(1;4;11)(p33;?;?), ins(8;22) |
| 24 | 46, XY, (10/18): t(1;13;15)(p22,q14q22); (1/18): t(1;11)(q21;q24), t(4;20)(q32;p13); (1/18): der(1)t(1;2)(1q32;p?); (6/18): normal |
| 25 | 46, XY, (13/15): der(17)t(4;17)(q22;q12); (2/15): normal |
| 26 | 46, XY, (19/19): t(14;18)(q32;q21) |
| 27 | 46, XY, (12/24;K1): der(16)t(2;16)(p21;p13), del(2)(p11p21); (7/24;K2): der(16)t(2;16)(p21;p13), del(2)(p11p21), der(4)t(2;4)(p;q13), der(7)t(4;7)(q13;q11?), der(13)t(7;13)(q31;q14); (4/24;K3): der(16)t(2;16)(p21;p13), del(2)(p11p21), der(4)t(2;4)(p;q13), der(7)t(4;7)(q13;q11?), der(13)t(7;13)(q31;q14), der(16)t(2;13;16); (1/24): normal |
| 28 | 46, XX, (19/19): der(1)t(1;1;1;11)(p21;p36.1;q43;q22), der(11)t(1;7;11)(q43;q22), t(6;13)(p21;q14), der(7)t(1;7)(p21;p13), der(12)t(1;7,12)(teils zw.p21-p36;p13); der(X)t(6;X)(q24;q21) |
| 29 | 46-70, XX, (16/16): i(17q); davon in (15/16): i(17q)t(15;16)(q25,q22); (12/15): i(17q)t(15;16), del(7)(q31-q36); (1/16): t(2;13)(q24;q14), i(5)(q); (1/16): der(22)t(19;22); (1/16): t(11;18), der(1)t(1;6)(?;q22), der(21;22)(q10;q10); (1/16): der(16)t(16;20); 5er quattrozentrisch; (1/16): der(22)t(18;22)(?;p11), del(6)(q15-q27); del(6)(q23-q27), del(11)(q14-q22); Triploide und tetraploide Karyotypen |
| 30 | 46, XY, (1/14): t(13;15)(q10;q10), der(6)t(6;13)(p22;q14), der(11)t(11;22)(q23;q12), der(X)t(X;11)(p21;q23); (11/14): del(13)(q14); (2/14): normal |
| 31 | 46, XY, (1/16): +15, +14, del(6)(q), del(4)(q), del(11)(q21-q25); (15/16): normal |
| 32 | 46, XY, (1/28): t(2;4), del(1)(q), del(7)(q), del(6)(q), del(4)(p), del(12)(p), (27/28): normal |
| 33 | 47, XX, (2/2): +12 |

Ergebnisse

| | |
|----|--|
| 34 | 46, XY, (15/15): normal |
| 35 | 47, XY, (7/7): +12 |
| 36 | 46, XY, (14/14): normal |
| 37 | 46, XY, (2/5): del(2)(q); (23/25): normal |
| 38 | 46, XY, (8/8): normal |
| 39 | 46, XX, (4/9): del(6)(q25q27), del(13)(q14); (5/9): normal |
| 40 | 46, XY, (25/25): normal |
| 41 | 45, XY, (7/24): der(X)t(X;14)(q21;q21); (17/24): normal |
| 42 | 46, XY, (5/9): der(13)t(2;13)(q32;p11), del(11)(q14q25), del(6)(q); (4/9): normal |
| 43 | 46, XY, (14/28): del(11)(q13), del(13)(q14); (1/28): del(13)(q14), der(11)t(2;11)(p13;q13); (1/28): i(9)(q); (1/28): del(13)(q14), der(11)t(2;11)(p13;q13), i(9)(q); (1/28): del(11)(q13), del(13)(q14), der(6)t(6;17)(p12;q12o21); (1/28): del(11)(q13), del(13)(q14), der(14)t(3;14)(p14;p11.2); (1/28):+2; (6/28): normal |
| 44 | 46, XY, (1/19): t(2;11)(q32;q13); (18/19): normal |
| 45 | 46, XY, (1/24): t(1;10)(q21;p12) reziprok; (23/24): normal |
| 46 | 46, XY, (6/22): del(11)(q23); (1/22): der(18)t(3;18)(p oder q;q21); (1/22): ins(8;8)(q23;?); (1/22): del(10)(q); (1/22): triploid; (1/22): tetraploid; (11/22): normal |
| 47 | 46, XY; (9/9): del(11)(q23) |
| 48 | 46, XX, (14/14): normal |
| 49 | 47, XY, (9/10): +12; (1/10): normal |
| 50 | 45, X0, (5/11): del(5)(q), del(9)(p); (6/11): normal |
| 51 | 46, XX, (9/12): del(11)(q13); (2/12): del(X)(p), (1/12): del(X)(q) |
| 52 | 46, XY, (2/15): +19; (1/15): +22; (12/15): normal |
| 53 | 46, XX, (5/7): +15p; (2/7): normal |
| 54 | 46, XY, (10/10): normal |
| 55 | 46, XY, (17/17): normal |
| 56 | 46, XY, (6/8): del(11)(q14-q23); (2/8): del(13)(q14) |
| 57 | 46, XX, (8/8): normal |
| 58 | 46, XY, (12/12): normal |
| 59 | 46, XY, (2/14): del(13)(q14); (12/14): normal |
| 60 | 46, XY, (10/10): normal |
| 61 | 46, XY, (6/29): del(11)(q13); (1/29): t(1;11)(q12;q12); (1/29): t(11;12)(q12;q12); (1/29): del(11)(q13-q21); (20/29): normal |
| 62 | 46, XY, (11/11): normal |
| 63 | 46, XY, (8/8): +12 |
| 64 | 46, XX, (3/7):del(9)(q); (1/7):+12; (1/7): del(9)(p); (2/7): normal |
| 65 | 46, XY, (10/10): normal |
| 66 | 46, XX, (14/14): normal |
| 67 | 46, XX, (2/25): del(9)(q31q34); (1/25): t(5;10)(q13;q22); (22/25): normal |
| 68 | 46, XY, (15/15): normal |
| 69 | 46, XX, (9/9): normal |
| 70 | 46, XY, (10/11,K1): del(11)(q13); (1/11,K1): del(11)(q21); (5/6, K2): del(13)(q); (1/6, K2): normal |
| 71 | 46, XY, (9/9): normal |
| 72 | 46, XX, (9/9): normal |
| 73 | 46, XY, (3/18): del(11)(q); (1/18): t(4;X)(q13;q12) reziprok; (1/18): del(2)(p), del(2)(q), del (4)(q), del(5)(q), del(6)(q), del(7)(q), del(12)(q); (13/18): normal |
| 74 | 46, XX, (1/4): t(X;10)(p21;p), (3/4): normal |
| 75 | 46, XY, (8/9): del(13)(q14), (1/9): normal |
| 76 | 46, XY, (1/18): t(1;7)(q21;q11.2) , (1/18): t(8;20); (16/18): normal |
| 77 | 46, XX, (15/15): normal |
| 78 | 46, XY, (17/19): +12; (2/19): +12, +19; (15/19): del(13)(q14) |
| 79 | 46, XY, (3/16): del(13)(q14); (13/16): normal |

Ergebnisse

| | |
|-----|---|
| 80 | 46, XX, (4/4): normal |
| 81 | 46, XY, (7/7): normal |
| 82 | 46, XX, (3/6): del(11)(q13-q23), (3/6): normal |
| 83 | 46, XY, (1/39): der(7)t(7;9)(q35;?), -9; (2/10): del(13)(q14); (6/10): del(11)(q14q23); (1/10): del(4)(q34-q35); (1/10): del(6)(q25-q27) |
| 84 | 46, XX, (6/8): del(13)(q14); (2/6): normal |
| 85 | 46, XY, (1/10): t(10;Xq13) ; (9/10): normal |
| 86 | 46, XY, (12/16): +2p, der(6)t(2;6)(p;q21), del(13)(q21-q34); (4/16): normal |
| 87 | 46, XY, (9/19): t(2;13)(q35?;q14); (1/19): t(20;17); (10/19) : normal |
| 88 | 46, XY, (10/13): -17, -18, -21, +22, der(Y)t(8;Y)(p21;p11.2), der(7)t(7;18)(q32;q11.2), ins(8;18)(q?;q12), der(22)t(17;22)(q12;p12), del(5)(p12), der(8)t(8;21)(p21;q21); (2/13): -8, -17, -18, +22, der(Y)t(8;Y)(p21;p11.2), der(7)t(7;18)(q32;q11.2), ins(8;18)(q?;q12), der(22)t(17;22)(q12;p12); (1/13): -4, -8, -17, -18, -21, der(Y)t(8;Y)(p21;p11.2), del(5)(p12), der(7)t(7;18)(q32;q11.2), ins (8;18)(q?;q12), der(8)t(8;21)(p21;q21), der(22)t(17;22)(q12;p12) |
| 89 | 46, XX, (2/13): t(10;13)(q24;q21); (11/13): normal |
| 90 | 46, X0, (13/13): +2, -13, -Y, der(2)t(2;18)(q11.2;q21), der(10)t(10;13), ins13, der(6)t(6;13)(6q22-24;q14?), del(13)(q |
| 91 | 46, XX, (6/16): del(5)(q); (1/16): der(16)t(16;21)(q?;q), del(5)(q); (1/16): +22; (8/16): normal |
| 92 | 46, XY, (11/13): del(11)(q); (1/13): t(5;12)(q31;q22); (1/13): t(2;9)(q33;p13); (1/13): del(6)(q) |
| 93 | 46, X0, (7/7): +12, -X |
| 94 | 46, XY, (3/6): del(4)(q); (1/6): del(4)(p); (1/6): +18; (1/6): normal |
| 95 | 46, XY, (9/9): normal |
| 96 | 46, XX, (10/10): normal |
| 97 | 46, XX, (6/12): del(13)(q14); (6/12): normal |
| 98 | 46, XX, (10/10): normal |
| 99 | 46, XX, (8/8): del(11)(q13) |
| 100 | 46, XY, (12/12): normal |
| 101 | 46, XY, (15/15): normal |
| 102 | 46, XY, (8/8): normal |
| 103 | 46, XY, (11/11): normal |
| 104 | 46, XY, (3/12): del(7)(q); (9/12): normal |
| 105 | 46, XX, (8/8): normal |
| 106 | 46, XY, (6/24): del(11)(q); (3/24): del(12)(p); (2/24): del(6)(p); (2/24): del(5)(q); (2/24): del(10)(q); (1/24): +7; (1/24): +20; (10/24): normal |
| 107 | 46, XX, (3/7): del15p-; (4/7): normal |
| 108 | 46, XY, (3/24): der(17)t(6;17)(q?22;q21); (1/24): der(17)(q10;q10), del(8)(p), del(17)(p); (1/24): der(3)t(3;14)(p12;q12), del(17)(p); (1/24): del(11)(q13), -12; (18/24): normal |
| 109 | 46, XY, (12/28): i(17q)(ins(17;17)(p11.2-12;q11.2)"qpq" ; (16/28): normal |
| 110 | 46, XY, (2/8, K1): del(11)(q23); (2/8, K2): del(11)(q23), der(X)t(X;2)(q21;p?), +2q; (2/8, K3): del(11)(q23), der(X)t(X;2)(q21;p?), +2q, del(12)(p); (2/8): normal |
| 111 | 46, XY, (11/19): del(11)(q14q23);(2/19): i(8q), del(11)(q14q23); (2/19): der(18)t(8;18)(podq;p11), del(11)(q14q23); (2/19): der(4)t(4;6)(p13;podq), der(12)t(6;12)(q;p12), del(11)(q14q23); (2/19): normal |
| 112 | 46, XY, (4/21): del(11)(q13); (2/21): t(1;15)(q12oq21;q15oq21); (1/21): der(3)t(3;7)(p21;q11.2); (1/21): der(3)t(3;13)q25?;q22?; (1/21): der(4)t(4;17)(p?13;q22?); (3/21): del(9)(q); (1/21): del(5)(q); (1/21): del(17)(p); (1/21):del(10)(q); (6/21): normal |
| 113 | 46, XX; (4/18): der(7)t(7;18)(q22;q21); (5/18): der(7)t(7;18)(q22;q21) (18q21-q23), t(19;22)(?;q13); (1/18): der(7)t(7;18)(q22;q21), der(X)t(X;20)(q13;?); (6/18): del(11)(q13); (2/18):normal |
| 114 | 64-68, XX (Patient männlich!), (1/17, K1): -Y, del(1)(p), der(1)t(1;9)(p13;q?), der(1)t(1;3)(q13;q?), t(2;5)(p14;q31), t(3;5)(p12;p13), del(7)(p), der(8)t(8;14)(p21;q?), del(8)(q), t(8;18)(?;p11.2), t(9;11;11;14)(q34;q25;p15;q32?), der(12)t(3;3;12)(?;p;q), t(13;19)(q21;?), t(14;16)(?; ?) auf Chr. 8, i(15q), t(4;19)(?;?), t(8;22)(?;q13); (2/17, K2): zusätzlich zu K1: der(8)t(8;14)(p21;q24); (2/17, K3): zusätzlich zu K2: t(X;10); (1/17, K4): zusätzlich zu K3:+6(teils); (1/17, K5): zusätzlich zu K3: der(6)t(6;10)(q25;?); (1/17, K6): zusätzlich zu K3: t(1;6), i(18q); (10/17): normal |

Ergebnisse

| | |
|-----|---|
| 115 | 46, XX, (5/22): del(2)(p14-ter); (1/22): der(4)t(4;13)(p13;q14); (1/22): der(6)t(6;13;3)(q15;q14;?); (1/22): del(11)(q13-q23); (1/22): del(10)(q); (13/22): normal |
| 116 | 46, XY, (8/8): del(11)(q23) |
| 117 | 46, XY, (3/28): del(13); (1/28): ins(6;7)(p12;??), t(7;13)(p13;q31), der(14)t(13;14)(q14;q24); (1/28): -13, t(7;13); (1/28): t(3;8;17)(q13;q12;q21odq12), der(6)t(6;13)(q21;q22); (1/28): del(17)(p oder q); (1/28): t(3;4)(q26;p13), inv(1)(q35;q31), del(1)(p35 bis Telomer); (1/28): t(3;4)(q13; q21); t(2;11)(q33;q13); t(6;9)(p12;p oder q), del(11)(q), der(8)t(8;14)(q24;q24); (19/28): normal |
| 118 | 46, XX; (1/10): t(1;3)(q21;q13); (9/10): normal |
| 119 | 46, XX, (7/7): del(13)(q14), del(11)(q23), del(6)(q23-q27) |
| 120 | 46, XY, (12/12): normal |
| 121 | 48, XX, (10/10): +3, +12 |
| 122 | 46, XX, (13/13): del(13)(q14); (4/13): del(11)(q23) |
| 123 | 46, XX, (5/6): del(9)(q22q34), del(11)(q13); (1/6): normal |
| 124 | 46, XY, (15/15): del(11)(q23); (5/15): del(12)(p) |
| 125 | 46, XY; (2/14): del(13)(q14); (1/14): +20, +22; (11/14): normal |
| 126 | 47, XY, (5/7): +12 |
| 127 | 46, XY, (13/13): normal |
| 128 | 46, XY, (5/11): del(13)(q21); (6/11): normal |
| 129 | 46, XY, (1/6): +3; (1/6): +8, (1/6): +15; (3/6): normal |
| 130 | 46, XX, (2/10): del(13)(q14); (3/10): del(11)(q23); (5/10): normal |
| 131 | 46, XY, (3/10): del(13)(q14); (2/10): del(11)(q23); (5/10): normal |
| 132 | 46,XX, (18/18): normal |
| 133 | 46, XX, (14/14): normal |
| 134 | Zytologie nicht beurteilbar |

35 Patienten (26%) zeigten einen normalen Chromosomensatz. Bei allen anderen Patienten konnten Aberrationen gefunden werden. Es konnten sowohl die durch I-FISH Untersuchungen bekannten, häufiger vorkommenden Deletionen 6q21 (3%), 11q22-25 (14%), 13q14 (15%) und 17p13 (2%) gefunden werden, aber auch bei der CLL seltener vorkommende Deletionen auf Chromosom 8q- (1%). Außerdem fanden sich die bei der CLL bekannten Trisomien des Chromosoms 12 (6%) und 2q (1%).

3.4.1.1. Translokationen

Zusätzlich zu den eben genannten Aberrationen konnten bei 31 (23%) der 134 Patienten balancierte und unbalancierte Translokationen gesichert werden, obwohl man bisher davon ausging, dass Translokationen bei der CLL keine Rolle spielen. Eine Translokation wurde als solche gewertet, wenn sie in mindestens drei unterschiedlichen Metaphasen nachgewiesen werden konnte.

Um auszuschließen, dass die Translokationen nur durch die Stimulation mit CD40L hervorgerufen wurden, und somit als Artefakte gewertet werden müssen, wurden unstimulierte, unkultivierte CLL-Zellen derselben Patienten hybridisiert. Diese Untersuchung wurde bei 26 (84%) der 31 Patienten mit Translokationen durchgeführt.

Ergebnisse

Bei 23% dieser Patienten fanden sich sowohl eine Deletion oder Translokation im Bereich 13q14 bei stimulierten Metaphasen, als auch eine Deletion von 13q14 bei der I-FISH Untersuchung der unstimulierten Zellen. Genauso konnten bei 12% der Patienten sowohl bei den stimulierten, als auch bei den unstimulierten Zellen eine Deletion bzw. Translokation von 11q22-25 und 17p13 gefunden werden. Eine Deletion und Translokation von 6q21 wurde bei 4% der Patienten gefunden, genauso wie eine Trisomie 12.

Zusätzlich wurde bei 17 Patienten (55%) ein Stimulationsprotokoll mit CpG-ODN und IL-2 angewandt, von dem bekannt ist, dass es keine Doppelstrangbrüche hervorruft.

Auch hier konnten dieselben Aberrationen nachgewiesen werden.

Bei 29 Patienten wurde die zytologische Untersuchung zum Zeitpunkt der Erstdiagnose gemacht. Hier konnten bei neun Patienten (31%) Translokationen gefunden werden, bei 20 Patienten (69%) zeigten sich keine Translokationen. Bei 72 Patienten wurde die zytologische Untersuchung zwölf Monate nach Erstdiagnose oder später durchgeführt. Hier hatten 16 Patienten Translokationen (22%), 56 Patienten (78%) keine Translokationen.

Translokationen traten bei Erstdiagnose ebenso häufig auf, wie bei Patienten mit längerem Krankheitsverlauf (>120 Monate; $P=0,353$). Von den Patienten die vor der zytologischen Untersuchung noch keine Chemotherapie erhalten hatten, zeigten 24 (23%) Translokationen, bei den vorthapierten Patienten waren es sieben (24%; $P=0,925$). Die Translokationen wurden bei jungen und alten Patienten gleich häufig gefunden ($P=0,846$). Männer hatten signifikant häufiger Translokationen als Frauen (Translokationsträger: Männer 71%, Frauen 29%; $P=0,011$). Die Daten lagen für 133 Patienten vor.

Translokationen waren nicht mit laborchemischen Prognosefaktoren assoziiert.

Im Vergleich mit den anderen Prognosefaktoren zeigte sich, dass bei einem höheren Binet Stadium Translokationen häufiger auftraten ($P=0,038$).

Ebenso konnten bei CD38 positiven Patienten signifikant häufiger Translokationen gefunden werden ($P=0,018$). Das Vorkommen einer im I-FISH gefundenen Deletion oder Trisomie prädestinierte die Patienten nicht für das Vorkommen einer Translokation. Bei sechs Patienten (16%), die im I-FISH einen normalen Karyotypen aufzeigten, fanden sich im M-FISH Translokationen.

Ergebnisse

Tabelle 32: Vorkommen von Translokationen nach Binet Stadium

| Binet Stadium | Keine Translokation vorhanden | Translokation vorhanden |
|---------------|-------------------------------|-------------------------|
| Binet A | 61 (85%) | 11 (15%) |
| Binet B | 24 (69%) | 11 (31%) |
| Binet C | 15 (62%) | 9 (38%) |

N=131

Tabelle 33: Vorkommen von Translokationen nach CD38-Status

| CD38-Status | Keine Translokationen vorhanden | Translokationen vorhanden |
|--------------|---------------------------------|---------------------------|
| CD38 positiv | 11 (55%) | 9 (45%) |
| CD38 negativ | 83 (80%) | 21 (20%) |

N=124

Tabelle 34: Vorkommen von Translokationen bei bekannten Deletionen und Trisomien, sowie bei normalem Karyotyp

| Karyotyp | Keine Translokationen vorhanden | Translokationen vorhanden |
|-------------------|---------------------------------|---------------------------|
| Del6q- | 28 (82%) | 6 (18%) |
| Del11q- | 17 (81%) | 4 (19%) |
| Del13q- mono | 40 (76%) | 13 (24%) |
| Del13q- bi | 7 (88%) | 1 (12%) |
| Del17p- | 12 (63%) | 7 (37%) |
| Trisomie 12 | 11 (92%) | 1 (8%) |
| Normaler Karyotyp | 32 (84%) | 6 (16%) |

N=122

Eine Übersicht der Translokationen in Zusammenschau mit den Vortherapien, dem Binet Stadium, der CD38-Expression und anderer chromosomaler Aberrationen gibt Tabelle 35. Insgesamt fanden sich bei diesen 31 Patienten 78 Translokationen, 35 balancierte Translokationen (45%) und 43 unbalancierte Translokationen (55%). Es konnten insgesamt 144 Bruchpunkte nachgewiesen werden, wovon 107 (74%) exakt einem Genlokus zugeordnet werden konnten (siehe Abbildung 11). 37 (26%) Bruchpunkte konnten keiner exakten Bande zugeordnet werden.

Die Mehrzahl der gefundenen Translokationen wurde zuvor noch nicht bei CLL-Patienten beschrieben und sie traten nicht wiederholt auf. Allerdings fiel auf, dass die meisten Bruchpunkte bereits mit anderen Partnerchromosomen beschrieben wurden. 25 Bruchpunkte (23%) sammelten sich in den Regionen an, die bei der CLL als Deletions- und Translokationsstellen bekannt sind (siehe Tabelle 35). 21 (20%) der Bruchpunkte fanden sich an bekannten Genloci anderer Lymphome/ Leukämien (siehe Tabelle 36). Insgesamt waren bei 94% der Patienten bekannte Bruchpunkte an den Aberrationen beteiligt.

Ergebnisse

Tabelle 35: Bekannte Bruchstellen bei Chromosomenaberrationen bei CLL-Patienten und deren Häufigkeit

| Lokus | Häufigkeit |
|--------------------|------------|
| 2p11-13 (Ig kappa) | 2% |
| 6q21 | 1% |
| 7q31 | 2% |
| 11q22-25 | 3% |
| 13q14 | 9% |
| 14q12 | 1% |
| 14q32 (IgH) | 4% |
| 17p13 | 0% |
| 18q32 | 2% |
| 22q11 (Ig lamda) | 0% |
| N=107 | |

Tabelle 36: Bekannte Bruchstellen bei Chromosomenaberrationen anderer Leukämien und Lymphome und deren Häufigkeiten

| Vorkommen | Lokus | Häufigkeit |
|-----------|--------------------|------------|
| T-ALL | 7q34-35 | 2% |
| + AML | 9q34 | 2% |
| | 10q24 | 1% |
| | 11p13 | 1% |
| + CML | 22q11 | 1% |
| Pre B-ALL | 5q31 | 1% |
| PML | 15q21 | 1% |
| | 17q21 | 1% |
| Lymphome | 1p32-36 | 5% |
| | 1q21-25 | 1% |
| | 18q21 (BCL2-Lokus) | 5% |
| N=107 | | |

Ergebnisse

Tabelle 35: Patienten mit Translokationen: Übersicht der Vortherapien, Binet Stadium, CD38-Expression und chromosomale Aberrationen (I-FISH, M-FISH)

| Patient | Tx vor | Zyto | Binet | CD38 | I-FISH del6q- | I-FISH del11q- | I-FISH del13q- | I-FISH del17p- | I-FISH +12 | Deletion/ Trisomien | Balancierte Translokationen | Unbalancierte Translokationen | N der untersuchten Metaphasen | N der Aberrationen |
|---------|--------|------|-------|------|---------------|----------------|----------------|----------------|--|---|--|-------------------------------|-------------------------------|--------------------|
| 1 | ja | C | neg. | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | (9/19):del(5)(p) | (8/19):t(10;18)(q22;p11) | (8/19):der(1)t(1;1)(p?;q32) (8/19):der(17)t(1;13;17)(q32;?;p12) | 19 | 4 | |
| 2 | ja | A | neg. | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | - | (9/9):t(14;18)(q32;q21) | - | 9 | 1 | |
| 3 | nein | A | neg. | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | (10/10):+12 (8/10):+19 (5/8):+18 | - | (8/13):der(7)t(7;11)(p21;p oder q) | 13 | 4 | |
| 4 | nein | A | neg. | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | - | (4/9):t(10;13)(q21;q14) reziprok | - | 9 | 1 | |
| 5 | nein | A | neg. | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | - | (14/14):t(3;13)(p12;q14) | - | 14 | 1 | |
| 6 | nein | C | neg. | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | - | (26/26):t(13;22)(q14;q11) | (26/26):der(17)t(17;18)(q10;q10) | 26 | 2 | |
| 7 | nein | B | neg. | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | - | - | (3/6):der(11)t(4;11)(q11;p13) (3/6):der(18)t(3;18)(?;q21) (2/6):der(8)ins(8;15)(p12;q?) | 6 | 3 | |
| 8 | ja | B | pos. | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | (5/5):del(13)(q14) | - | (5/29):der(8)t(2;8)(p?;p12) | 29 | 2 | |
| 9 | ja | C | neg. | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | - | (12/12):t(3;13)(p22;q14) (12/12):t(3;14)(p22;q32) (12/12):t(8;15)(p21;q15) (12/12):t(13;16)(q14,q13) (12/12):t(8;20)(?;?) (12/12):t(4;6)(?;q15) (12/12):t(1;4)(p33;?) (12/12):t(1;4;11)(p33;?;?) | (12/12):der(17;18)(q10;q10) (12/12):ins(8;22) | 12 | 10 | |
| 10 | ja | B | pos. | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | - | (10/18):t(1;13;15)(p22;q14;q22) | - | 18 | 1 | |
| 11 | nein | A | neg. | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | - | - | (15/15):der(17)t(4;17)(q22;q12) | 15 | 1 | |
| 12 | ja | B | neg. | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | - | (9/9):t(14;18)(q32;q21) | - | 9 | 1 | |
| 13 | nein | B | neg. | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | (19/24):del(2)(p11p21) | - | (19/24):der(16)t(2;16)(p21;p13) (7/24):der(13)t(7;13)(q31;q14) (7/24):der(4)t(2;4)(p?;q13) (7/24):der(7)t(4;7)(q13;q11) | 25 | 5 | |

Ergebnisse

| Patient | Tx vor | Zyto | Binet | CD38 | I-FISH del6q- | I-FISH del11q- | I-FISH del13q- | I-FISH del17p- | I-FISH +12 | Deletion/ Trisomien | Balancierte Translokationen | Unbalancierte Translokationen | N der untersuchten Metaphasen | N der Aberrationen |
|---------|--------|------|-------|------|---------------|----------------|----------------|----------------|------------|---|---------------------------------|--|-------------------------------|--------------------|
| 14 | nein | B | neg. | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | - | | (19/19):t(6;13)(p21;q14) | (19/19):der(1)t(1;1;1;11)(p21;p36.1;q43;q22) (19/19):der(11)t(1;7;11)(q43;?:q22) (19/19):der(7)t(1;7)(p21;p13) (19/19):der(12)t(1;7,12)(p21-p36;p13;p) (19/19):der(X)t(6;X)(q24;q21) | 19 | 6 |
| 15 | nein | B | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | | (12/15):del(7)(q31-q36) | (15/16);i(17q)t(15;16)(q25,q22) | - | 16 | 2 |
| 16 | nein | B | neg. | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | - | | - | (7/24):der(X)t(X;14)(q21;q21) | 24 | 1 |
| 17 | nein | B | pos. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | | (5/9):del(11)(q14-q25) (5/9):del(6)(q) | - | (5/9):der(13)t(2;13)(q32;p11) | 9 | 3 |
| 18 | nein | C | pos. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | | (14/19):del(11)(q13) (14/19):del(13)(q14) | (2/28):i(9q) | (2/28):der(11)t(2;11)(p13;q13) | 28 | 4 |
| 19 | nein | A | pos. | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | | (12/16):+2 | - | (12/16):der(6)t(2;6)(p oder q;q21) | 16 | 3 |
| 20 | nein | A | neg. | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | - | | (9/19):t(2;13)(q35;q14) | - | 19 | 1 |
| 21 | nein | C | neg. | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | | (11/13):del(5)(p12) (13/13):-8 (13/13):-17 (13/13):-18 (13/13):-21 (13/13):+22 | - | (13/13):der(Y)t(8;Y)(p21;p11.2) (13/13):der(7)t(7;18)(q32;q11.2) (13/13):ins(8;18)(q?;q12) (12/13):der(22)t(17;22)(q12;p12) (11/13):der(8)t(8;21)(p21;q21) | 13 | 11 |
| 22 | nein | A | neg. | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | - | | (2/13):t(10;13)(q24;q21) | - | 13 | 1 |
| 23 | nein | C | neg. | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | | (11/13):+2 (13/13):-Y | - | (10/13):der(2)t(2;18)(q11.2;q21) (10/13):der(10)t(10;13) (10/13):ins13 | 13 | 6 |
| 24 | nein | C | pos. | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | - | | - | (2-3/24):der(17)t(6;17)(q22;q21) | 24 | 1 |
| 25 | nein | B | pos. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | | (4/8):+2Teil | | (4/8):der(X)t(X;2)(q21;p?) | 8 | 4 |
| 26 | nein | B | pos. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | | (14/19):del(11)(q14-q23) | (2/19):i(8q) | (2/19):der(18)t(8;18)(p oder q;p11) (2/19):der(4)t(4;6)(p13;p oder q) (2/19):der(12)t(6;12)(q;p12) | 19 | 5 |
| 27 | nein | C | neg. | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | (3/21):del(9)(q) (4/6):del(11)(q13) | (2/21):t(1;15)(q21;q21) | - | 21 | 3 |
| 28 | nein | A | pos. | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | (6/17):del(11)(q13) (5/18):+18(q21-q23) | (5/18):t(19;22)(?;q13) | (10/18):der(7)t(7;18)(q22;q21) | 18 | 4 |

Ergebnisse

| Patient | Tx vor | Zyto | Binet | CD38 | I-FISH del6q- | I-FISH del11q- | I-FISH del13q- | I-FISH del17p- | I-FISH +12 | Deletion/ Trisomien | Balancierte Translokationen | Unbalancierte Translokationen | N der untersuchten Metaphasen | N der Aberrationen |
|---------|--------|------|-------|------|---------------|----------------|----------------|----------------|------------|---|---|---|-------------------------------|--------------------|
| 29 | nein | A | neg. | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | (7/17):del(1)(p) (7/17):del(7)(p) (7/17):del(8)(q) (7/17):-Y | (7/17):t(2;5)(p14;q31) (7/17):t(3;5)(p12;p13) (7/17):t(8;18)(?;p11.2) (7/17):t(9;11;11;14)(q34;q25;p15;q32) (7/17):t(13;19)(q21;?) (7/17):t(14;16)(?;?) alles auf Chr. 8 (7/17):i(15q) (7/17):t(4;19)(?,?) (7/17):t(8;22)(?;q13) (4/17):t(X;10)(?;?) | (7/17):der(1)t(1;9)(p13;q?) (7/17):der(1)t(1;3)(q13;q?) (7/17):der(8)t(8;14)(p21;q24) (7/17):der(12)t(3;3;12)(?;p;q) | 17 | 18 |
| 30 | nein | A | neg. | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | - | - | (12/28):i(17q)(ins(17;17)(p11.2-12;q11.2)"qpq" | 28 | 1 |
| 31 | ja | C | neg. | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | (9/9):del(11)(q13) (9/9):del(13)(q14) | (9/9):i(12q) (9/9):i(12p) | - - | 1 | 4 |

N=31

Interphase-FISH (I-FISH): 0=keine Aberrationen; 1=Aberrationen

Multiplex-FISH (M-FISH): die Ziffern in den Klammern geben die Häufigkeiten der Translokationen in den untersuchten Metaphasen an

n.d.: Untersuchung nicht durchgeführt

CD38 neg.: CD38<30%

CD38 pos.: CD38>30%

-: keine Aberration entdeckt

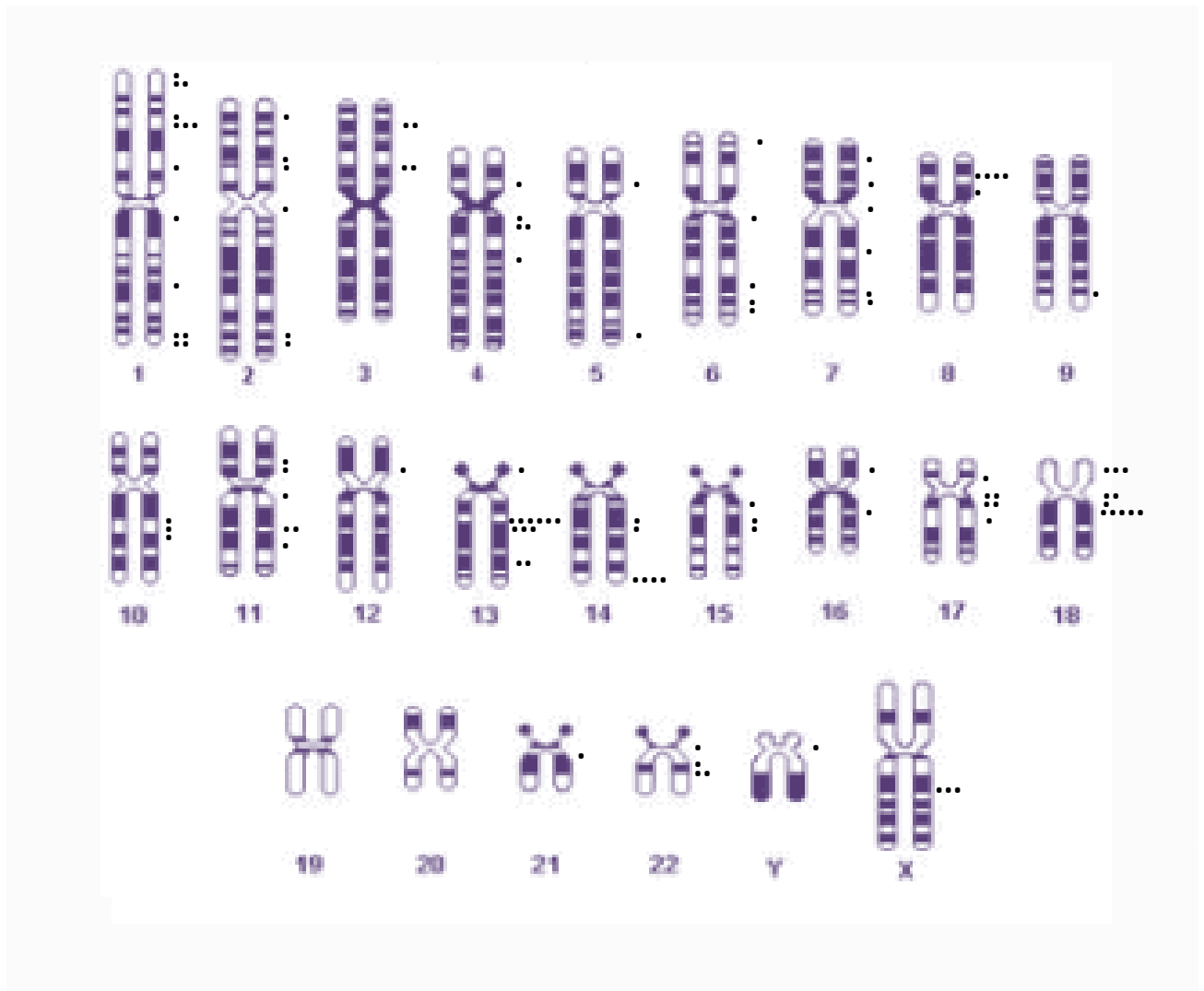


Abbildung 11: Die Verteilung der Bruchpunkte die mit der Metaphase-Analyse bei 31 Patienten mit CLL entdeckt wurden. Bei 31 (23%) von 134 untersuchten Patienten wurden 78 Translokationen gefunden. Vier Patienten (Patient 1, 10, 14 und 29 aus Tabelle 35) hatten Translokationen, bei denen drei Bruchpunkte involviert waren, zwei Patienten hatten Translokationen mit vier Bruchpunkten. Die Anzahl der Gesamtbruchpunkte liegt bei 144. Jeder Punkt stellt eine einzelne Bruchstelle dar. 107 Bruchstellen sind in dieser Darstellung eingezeichnet. 37 Bruchpunkte konnten auf dem jeweiligen Chromosom keiner Bande eindeutig zugeordnet werden und wurden deshalb nicht im Karyogramm als Punkt dargestellt. Die Inversionen und Insertionen wurden nicht im Karyogramm eingezeichnet.

Das Vorkommen von Translokationen als neuen Prognosefaktor wurde im Hinblick auf das TFS der CLL-Patienten untersucht. Da die Bruchpunkte der Translokationen so unterschiedlich waren und keine Translokationen gehäuft vorkamen, war es schwierig die Patienten mit Translokationen in Gruppen einzuteilen. Deshalb wurden alle Patienten mit Translokationen als eine Gruppe analysiert. Die Anzahl der pro Patient gefundenen Translokationen wurde nicht unterschieden, da sich kein signifikanter Unterschied zeigte ($P=0,162$).

In univariaten Analysen zeigte sich ein signifikanter Unterschied im TFS bei Patienten mit Translokationen, zu solchen ohne Translokationen ($P=0,002$).

Ergebnisse

Es gab keinen signifikanten Unterschied zwischen den TFS-Zeitintervallen von Patienten mit balancierten/ unbalancierten Translokationen oder einem Vorkommen von beiden Translokationen ($P=0,882$).

Tabelle 37: Univariate Datenanalyse: Translokationen vs. TFS in Monaten.

| Prognosefaktor für das TFS | Median des TFS bei Translokationen | Anzahl der Patienten | Median des TFS ohne Translokationen | Anzahl der Patienten | P | Signifikanz |
|----------------------------|------------------------------------|----------------------|-------------------------------------|----------------------|-------|-------------|
| Translokationen | 46 (14-78) | 26 (26%) | 89 (77-101) | 75 (56%) | 0,002 | signifikant |

Auffällig war, dass 66% der Patienten mit Translokationen nach den Ergebnissen der I-FISH Untersuchung eigentlich eine gute oder mittlere Prognose gehabt hätten. 15% hatten im I-FISH einen normalen Chromosomensatz, 35% eine Deletion 13q-, 4% eine Trisomie 12 und 12% eine Deletion 6q-.

Nach der Untersuchung der CD38-Expression sind 70% dieser Patienten CD38 negativ. 35% von ihnen befanden sich im Binet Stadium A.

Diese Patienten wären nun nach den herkömmlichen Untersuchungsmethoden nicht in die Gruppe der Patienten mit einer schlechten Prognose eingeordnet worden.

Durch die Bestimmung der Translokationen können Patienten identifiziert werden, die in einem frühen Krankheitsstadium fälschlicherweise in der guten oder mittleren Prognosegruppe sind. Vergleicht man das TFS der Patienten mit Translokationen (Median des TFS in Monaten: 46 Monate) mit dem TFS der Patienten mit einer Deletion 11q- oder 17p- (Median des TFS in Monaten jeweils 38 Monate) zeigt sich kein signifikanter Unterschied ($P=0,365$). Das heißt, dass man mit dem Nachweis von Translokationen Patienten mit einer sehr schlechten Prognose identifizieren kann.

Wie in Tabelle 31 dargestellt, wurden neben den Translokationen noch weitere strukturelle und numerische Aberrationen gefunden. Es zeigten sich zum Teil sehr komplex aberrante Karyotypen, die häufig mit Translokationen vergesellschaftet sind.

Ergebnisse

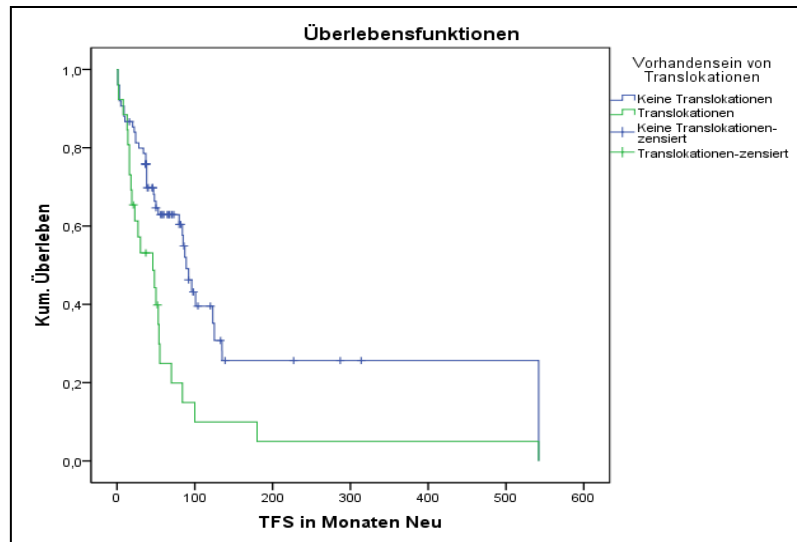


Abbildung 12: TFS von Patienten mit oder ohne Translokationen.

N ohne Translokationen=75; N mit Translokationen=26.

3.4.1.2. Komplex aberrante Karyotypen

Die Untersuchung der Metaphasen zeigte bei 74% der Patienten die unterschiedlichen Aberrationen. In die Untersuchung gingen die Daten von 122 Patienten ein. Gezählt wurden Deletionen, Translokationen, Inversionen, Insertionen und numerische Aberrationen, wenn diese in drei oder mehr Metaphasen nachgewiesen werden konnten. Sie konnten, ebenso wie die Translokationen, unabhängig davon gefunden werden, ob die Erkrankung gerade erst diagnostiziert worden war, ein längerer Krankheitsverlauf vorlag (>120 Monate; $P=0,387$), die Patienten therapienaiv waren, oder bereits eine Chemotherapie erhalten hatten ($P=0,875$).

Bei 30 Patienten (25%) wurde eine Aberration, bei 33 Patienten (27%) zwei Aberrationen, bei 27 Patienten (22%) drei oder mehr Aberrationen (Spannweite: 3-18 Aberrationen pro Metaphase) gefunden. Zeigte ein Karyotyp drei oder mehr Aberrationen wurde er als komplex aberranter Karyotyp definiert.

Komplex aberrante Karyotypen waren nicht mit laborchemischen Prognosefaktoren, dem Alter ($P=0,891$), oder dem Geschlecht ($P=0,982$) der Patienten assoziiert. Im Vergleich mit den anderen Prognosefaktoren zeigte sich, dass sie bei einem höheren Binet Stadium nicht signifikant häufiger auftraten ($P=0,084$). Bei CD38 positiven Patienten konnten signifikant häufiger komplex aberrante Karyotypen gefunden werden ($P=0,024$). Bei zwei Patienten (6%), die im I-FISH einen normalen Karyotypen aufzeigten, fanden sich im M-FISH komplex aberrante Karyotypen. Komplex aberrante Karyotypen wurden bei keiner aus der I-FISH Untersuchung bekannten Deletion vermehrt gefunden.

Ergebnisse

Tabelle 38: Vorkommen von komplex aberranten Karyotypen nach Binet Stadium bei Erstdiagnose

| Binet Stadium | Kein komplexer Karyotyp vorhanden | Komplexer Karyotyp vorhanden |
|---------------|-----------------------------------|------------------------------|
| Binet A | 70 (82%) | 16 (59%) |
| Binet B | 15 (17%) | 11 (41%) |
| Binet C | 1 (1%) | 0 |

N=113

Tabelle 39: Vorkommen von komplex aberranten Karyotypen nach dem CD38-Status

| CD38-Status | Kein komplexer Karyotyp vorhanden | Komplexer Karyotyp vorhanden |
|--------------|-----------------------------------|------------------------------|
| CD38 positiv | 10 (11%) | 9 (33%) |
| CD38 negativ | 79 (89%) | 18 (67%) |

N=116

63% der Patienten mit komplex aberranten Karyotypen haben Translokationen. Bei Patienten mit einem komplex aberranten Karyotypen zeigte sich ein signifikanter Unterschied im TFS zu Patienten ohne komplex aberranten Karyotypen ($P=0,002$). Diese Gruppe der Patienten mit komplex aberranten Karyotypen stellt ebenso eine neue, prognostisch ungünstigere Subpopulation dar.

Es zeigte sich, dass es bei einem komplex aberranten Karyotypen für das TFS nicht entscheidend ist, ob auch Translokationen vorkommen oder andere Aberrationen vorliegen, da auch Patienten ohne Translokationen ein schlechtes TFS haben (Median des TFS bei komplex aberrantem Karyotypen mit Translokationen: 30 Monate; Median des TFS bei komplex aberrantem Karyotypen ohne Translokationen: 28 Monate; siehe Tabelle 38). Somit könnten die Translokationen nur ein Epiphänomen sein. In diesem Fall käme es letztendlich nur auf die Anzahl der Aberrationen an, die die schlechte Prognose bedingen. Das Vorkommen von Translokationen als solche hätte keine prognostische Bedeutung. Dagegen spricht allerdings, dass bei 45% der Patienten mit Translokationen kein komplex aberranter Karyotyp vorlag. Auch sie hatten ein signifikant kürzeres TFS ($P=0,007$).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das Vorkommen von Translokationen und komplex aberranten Karyotypen eine neue prognostische Untergruppe definiert, da diese Patienten ein signifikant kürzeres TFS als Patienten ohne Translokationen und ohne komplex aberrante Karyotypen haben. Der Großteil der Patienten wäre zu Krankheitsbeginn mit der alleinigen Bestimmung der herkömmlichen Prognosefaktoren falsch eingeordnet worden. Somit ist die zusätzliche Untersuchung der Patienten mit der M-FISH Methode durchaus sinnvoll, um die Prognose der Patienten besser vorherbestimmen zu können.

Ergebnisse

Tabelle 40: Univariate Datenanalyse: Komplex aberranter Karyotyp vs. TFS in Monaten.

| Prognosefaktor für das TFS | Median des TFS bei komplexem Karyotyp | Anzahl der Patienten | Median des TFS ohne komplexem Karyotyp | Anzahl der Patienten | P | Signifikanz |
|---|---------------------------------------|----------------------|--|----------------------|-------|-------------|
| Komplexer Karyotyp gesamt | 46 (14-78) | 26 (26%) | 89 (77-101) | 75 (74%) | 0,002 | signifikant |
| Komplexer Karyotyp mit Translokationen | 30 (0-80) | 15 (29%) | 96 (88-114) | 36 (71%) | 0,000 | signifikant |
| Komplexer Karyotyp ohne Translokationen | 28 (12-44) | 6 (14%) | 96 (88-114) | 36 (86%) | 0,007 | signifikant |

N=102

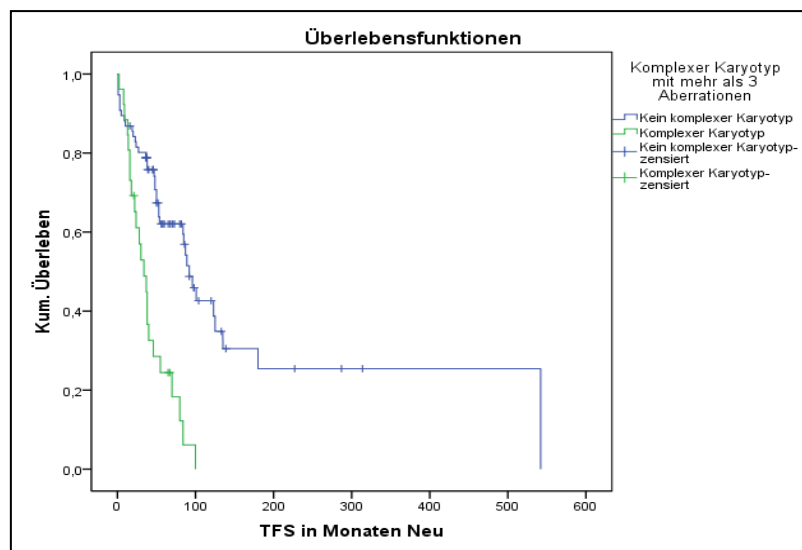


Abbildung 13: TFS von Patienten mit oder ohne einen komplex aberranten Karyotypen.

N ohne komplex aberranten Karyotyp=76.

N komplex aberranten Karyotyp=26.

3.4.1.3. Vergleichende Analyse der etablierten und neuen Prognosefaktoren

Wir untersuchten nun in einer univariaten Datenanalyse, ob es im Vergleich der bereits etablierten Prognosefaktoren zu einem kürzeren TFS kommt, wenn die betroffenen Patienten zusätzlich Translokationen oder einen komplex aberranten Karyotypen vorweisen. Alle zuvor beschriebenen Prognosefaktoren wurden verglichen. Da bei keinem der ZAP-70 positiven Patienten Translokationen und komplex aberrante Karyotypen nachgewiesen werden konnten, lief die ZAP-70-Expression nicht als Faktor mit in die Berechnungen ein. Eine signifikant schlechtere Prognose konnte nur für wenige Faktoren nachgewiesen werden (siehe Tabelle 39 und 40).

CD38 negative Patienten und solche, die Deletionen auf 6q- und 13q- aufweisen und somit eigentlich eine gute Prognose haben, zeigten eine signifikante Verschlechterung in Kombination mit einem komplex aberranten Karyotypen. Patienten mit einem positiven

Ergebnisse

CD38-Status und einem komplex aberranten Karyotypen zeigten eine sehr schlechte Prognose mit einem TFS von 18 Monaten im Median ($P=0,002$).

Aber auch bei Patienten mit hohen β -2-Mikroglobulinwerten und dem zusätzlichen Vorkommen von Translokationen verschlechtert sich die Prognose. Der Zusammenhang hierfür ist unklar.

Tabelle 41: Vergleich etablierter Prognosefaktoren mit Translokationen vs. TFS in Monaten

| Positiver Faktor | Median (95%KI) mit Translokationen | Anzahl der Patienten | Median (95%KI) ohne Translokationen | Anzahl der Patienten | P | Signifikanz |
|-------------------|------------------------------------|----------------------|-------------------------------------|----------------------|-------|-------------|
| TFS/ β -2-M | 16 (0-40) | 3 | 89 (15-163) | 11 | 0,002 | signifikant |

N=56

Tabelle 42: Vergleich etablierter Prognosefaktoren mit komplex aberranten Karyotypen vs. TFS in Monaten

| Positiver Faktor | Median (95%KI) mit komplexem Karyotyp | Anzahl der Patienten | Median (95%KI) ohne komplexem Karyotyp | Anzahl der Patienten | P | Signifikanz |
|------------------|---------------------------------------|----------------------|--|----------------------|-------|-------------|
| TFS/CD38 | 18 (7-29) | 5 | 50 (23-77) | 10 | 0,038 | signifikant |
| TFS/Del6q- | 37 (26-48) | 12 | 96 (34-158) | 13 | 0,016 | signifikant |
| TFS/Del13q- | 38 (33-43) | 17 | 85 (80-90) | 34 | 0,000 | signifikant |

N=100

Die Patienten mit Translokationen und komplex aberranten Karyotypen wurden mit Hilfe einer multivariaten Datenanalyse nach dem Cox-Regressionsmodell auf ihren möglichen prädiktiven Wert bezüglich des progressionsfreien Überlebens untersucht.

Die Variablen mit dem höchsten Log Rank in der univariaten Analyse wurden in die Analyse eingeschlossen: Translokationen, komplex aberrante Karyotypen, Deletion 17p-, CD38-Expression und das Binet Stadium. Die Ergebnisse des Cox-Regressionsmodells sind in der Tabelle 43 dargestellt.

Bezüglich des progressionsfreien Überlebens zeigten sich ein komplex aberranter Karyotyp, das Binet Stadium und eine erhöhte CD38-Expression als unabhängige Prognosefaktoren, wobei die Patienten mit komplex aberranten Karyotypen die schlechteste Prognose hatten. Da das Erhalten einer Chemotherapie vor der zytologischen Untersuchung einen signifikanten Einfluss auf die Prognose hat, wurde die Analyse nach dem Vorkommen von Vortherapien geschichtet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 44 dargestellt.

Die multivariate Datenanalyse zeigt, dass sich ein komplex aberranter Karyotyp als unabhängiger Prognosefaktor für das progressionsfreie Überleben eignet. Für das Vorkommen von Translokationen zeigte sich keine Unabhängigkeit.

Ergebnisse

Tabelle 43: Ergebnisse des Cox-Regressionsmodells für TFS in Monaten bei Nachweis eines komplex aberranten Karyotypen

| Variable | 95% KI | P | Signifikanz |
|-----------------------------|-----------|-------|-------------|
| Komplex aberranter Karyotyp | 1,47-6,59 | 0,003 | signifikant |
| Binet Stadium | 0,00-0,55 | 0,010 | signifikant |
| CD38-Expression | 1,20-6,05 | 0,016 | signifikant |

N=93

Tabelle 44: Ergebnisse des Cox-Regressionsmodells geschichtet nach Anzahl der Vortherapien für das TFS in Monaten bei Nachweis eines komplex aberranten Karyotypen

| Variable | 95% KI | P | Signifikanz |
|----------------------------------|-----------|-------|-------------|
| TFS: Komplex aberranter Karyotyp | 1,49-6,24 | 0,002 | signifikant |

3.4.2. Bilder

Die folgenden M-FISH Karyotypen stammen von Patienten mit Translokationen der Tabelle 31.

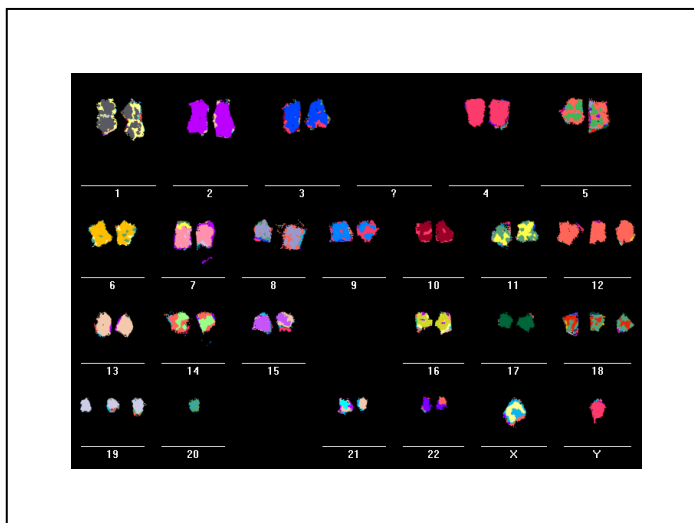


Foto 8: Patient 3: Nachweis von unbalancierten Translokationen und einem komplex aberranten Karyotyp: (8/13):der(7)t(7;11)(p21;p od.q), (10/10):+12, (8/10):+19, (5/8): +18

Ergebnisse

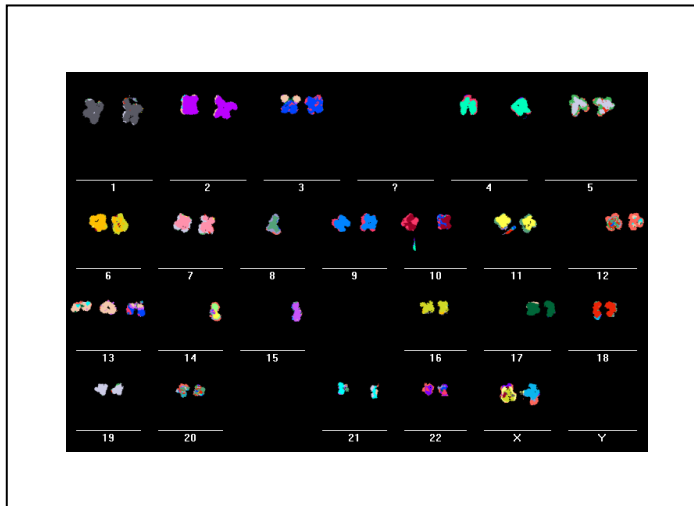


Foto 9: Patient 5: Nachweis von balancierten Translokationen:
(14/14):t(3;13)(p12;q14).

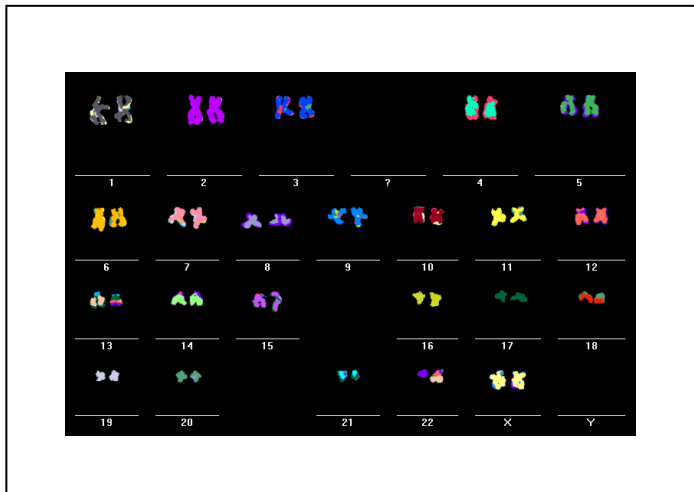


Foto 10: Patient 6: Nachweis von balancierten und unbalancierten Translokationen:(26/26):t(13;22)(q14;q11); (26/26):der(17;18)(q10;q10).

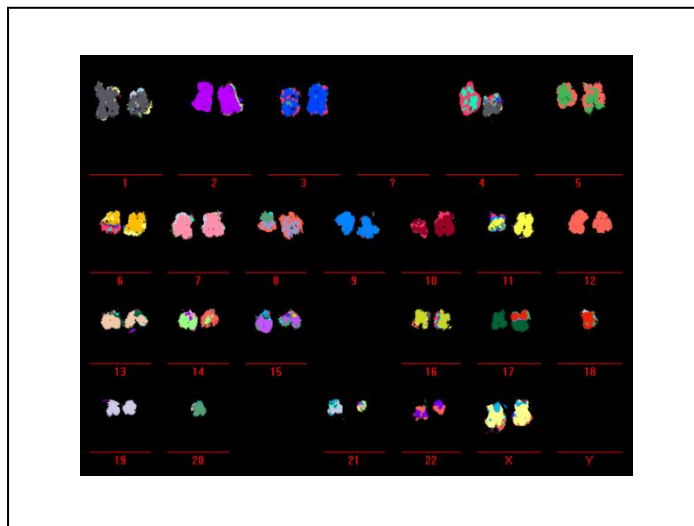


Foto 11: Patient 9: Nachweis balancierter und unbalancierter Translokationen und eines komplex aberranten Karyotypen (12/12):t(3;13)(p22;q14), t(3;14)(p22;q32), t(8;15)(p21;q15), t(13;16)(q14;q13), t(8;20)(?;?), t(4;6)(?;q15), t(1;4)(p33;?),t(1;4;11)(p33;?;?); (12/12):der(17;18)(q10;q10); ins (8;22).

Ergebnisse

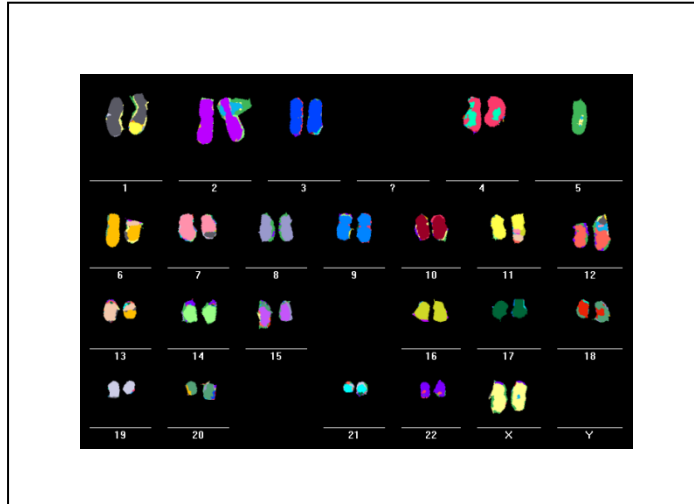


Foto 12: Patient 14: Nachweis von balancierten und unbalancierten Translokationen: (19/19):t(6;13)(p21;q14); (19/19):der(1)t(1;1;1;11)(p21;p36.1;q43;q22), der(11)t(1;7;11)(q43;?;q22), der(7)t(1;7)(p21-p36;p13), der(12)t(1;7,12)(teil zw.p21-p36;p13;p), der(X)t(6;X)(q24;q21).

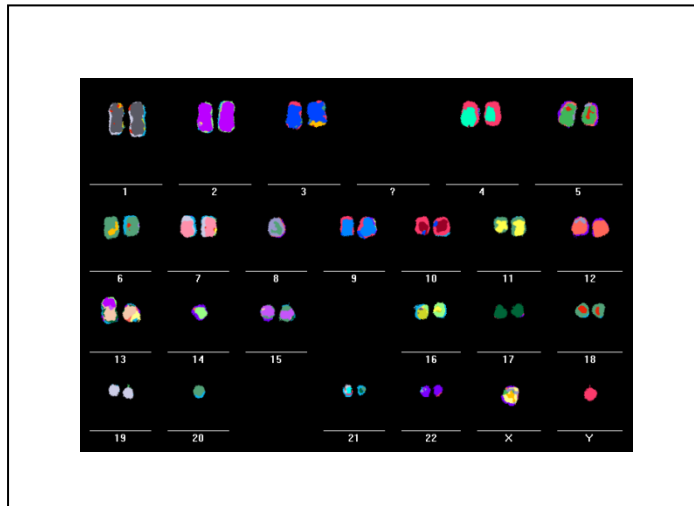


Foto 13: Patient 17: Nachweis von unbalancierten Translokationen und einem komplex aberranten Karyotypen: (5/9):der(13)t(2;13)(q32;p11); (5/9): del(11)(q14-q25), del(6)(q).

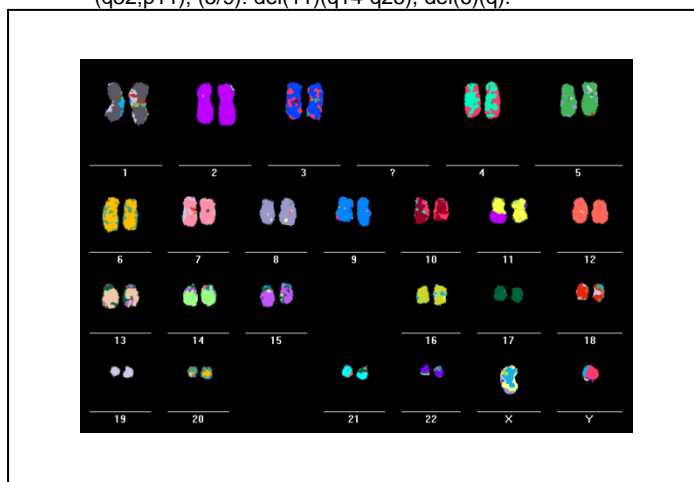


Foto 14: Patient 18: Nachweis von balancierte und unbalancierten Translokationen und einem komplex aberranten Karyotypen: (2/28):i(9q)(2/28): der(11)t(2;1)(p13;q13); (14/19):del(11)(q13), del(13)(q14).

Ergebnisse

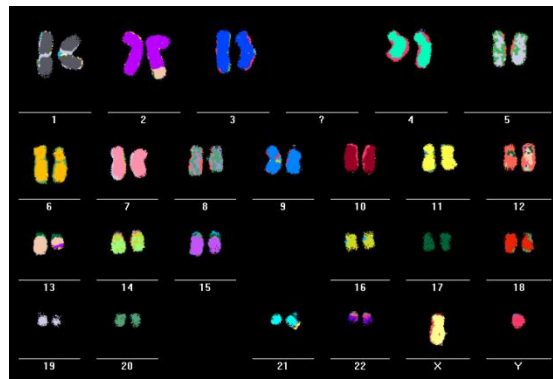


Foto 15: Patient 20: Nachweis von balancierten Translokationen:
(9/19):t(2;13)(q35;q14).

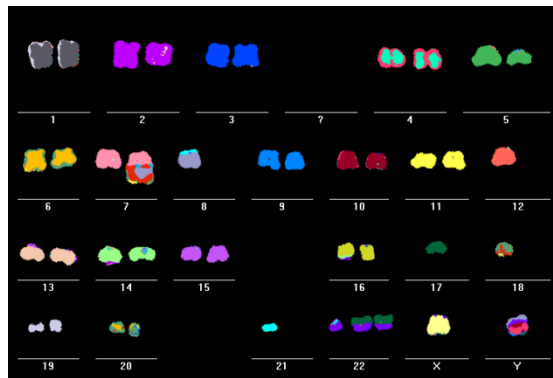


Foto 16: Patient 21: Nachweis von unbalancierten Translokationen und einem komplex aberranten Karyotypen: (13/13): der(Y)t(8;Y)(p21;p11.2), der(7)t(7;18)(q32;q11.2), ins(8;18)(q?;q12); (12/13): der(22)t(17;22)(q12;p12); (11/13):der(8)t(8;21)(p21;q21); (11/13): del(5)(p12); (13/13):-8, -17, -18, -21, +22.

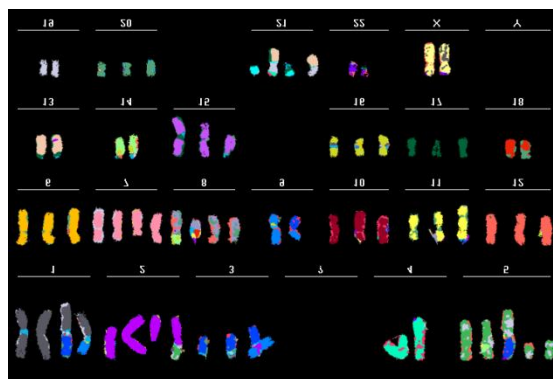


Foto 17: Patient 29: Nachweis von balancierten und unbalancierten Translokationen und einem komplex aberranten Karyotypen: (7/17): t(2;5)(p14;q31), t(3;5)(p12;p13), t(8;18)(?;p11.2), t(9;11;11;14)(q34;q25;p15;q32), t(13;19)(q21;), t(14;16)(?;?) alles auf Chr. 8, i(15q), t(4;19)(?;?), t(8;22)(?;q13);(4/17):t(X;10)(?;?); (7/17): der(1)t(1;9)(p13;q?), der(1)t(1;3)(q13;q?), der(8)t(8;14)(p21;q24), der(12)t(3;3;12)(?;p;q); t(7/17):del(1)(p), del(7)(p), del(8)(q), -Y.

4. Diskussion

Die B-CLL ist die häufigste Leukämie des Erwachsenen und zeigt sehr unterschiedliche Verlaufsformen. In den vergangenen Jahren gab es zwar große Fortschritte in Hinsicht auf die Risikostratifizierung bei CLL-Patienten, jedoch konnte bisher trotz der Etablierung verschiedener klinischer, serologischer, immunologischer und zytogenetischer Einzelfaktoren noch kein ausreichendes Risikoprofil erstellt werden, um eine optimale, risikoadaptierte Therapie für den einzelnen Patienten zu finden.

In der vorliegenden Arbeit wurden 146 CLL-Patienten sowohl auf ihre klinischen, serologischen und immunologischen, als auch auf ihre zytogenetischen Risikofaktoren untersucht. Der Großteil der Patienten wurde bereits kurz nach Erstdiagnose der Erkrankung in die Untersuchung eingeschlossen, da es das Ziel war, möglichst nicht therapierte Patienten zu untersuchen, um eine chemo- oder strahlentherapiebedingte Veränderung des Genoms und eine klonale Evolution im Rahmen des Krankheitsprogresses auszuschließen. Zur Ergänzung der gängigen Prognoseparameter wurden die CLL-Patienten auf numerische und strukturelle zytogenetische Aberrationen mit M-FISH untersucht (Speicher et al, 1996). Um eine detaillierte Chromosomenanalyse mit M-FISH durchführen zu können, wurden die CLL-Zellen mit CD40L (Buhmann et al, 1999 und 2002) oder CpG-ODN und IL-2 (Decker et al, 2000) stimuliert. Die hier gefundenen Translokationen und komplex aberranten Karyotypen wurden auf ihre Häufigkeit, sowie ihre prognostische Aussagekraft im Vergleich zu etablierten Prognosefaktoren bei unseren 146 CLL-Patienten untersucht.

Im Fokus der Untersuchung stand nun sowohl der Einfluss der bekannten, als auch der neuen Prognosefaktoren auf unser Patientenkollektiv. Zielpunkt war das progressionsfreie Überleben. Aufgrund des langwierigen Krankheitsverlaufs der CLL sind aussagekräftige Daten über das Gesamtüberleben erst nach einer langen Beobachtungszeit verfügbar. Deshalb sind für die Bestimmung der Prognose vor allem die Daten des progressionsfreien Überlebens wichtig.

4.1. Vergleichende Analyse der etablierten Faktoren und deren Einfluss auf die Prognose

4.1.1. Klinische Daten und Laborparameter

Obwohl man heute weiß, dass die Bestimmung einiger molekularer und biologischer Charakteristika der CLL-Zellen eine aussagekräftige Vorhersage der Prognose bei einer Großzahl der CLL-Patienten erlaubt, werden dennoch die klinischen Daten und Laborparameter standardmäßig bestimmt, da viele der Untersuchungstechniken nicht überall verfügbar sind, zu kostenintensiv sind, oder sich zwischen den einzelnen Labors schlecht standardisieren lassen. Außerdem sind sie, im Unterschied zu den anderen Prognosefaktoren, nützlich um das aktuelle Ausmaß der Erkrankung und die Notwendigkeit eines Therapiebeginns zu bestimmen. Somit sind die klinischen Daten und Laborparameter trotzdem immer noch ein wichtiger Bestandteil der Prognosefaktoren und komplettieren in Kombination mit den anderen Faktoren die möglichst genaue Vorhersage des Krankheitsverlaufs.

Patienten mit einem fortgeschrittenen Binet Stadium (TFS: im Median 1-33 Monate; $P < 0,0001$), und diejenigen, die bereits eine oder mehrere Chemotherapien (TFS: im Median 8-13 Monate; $P < 0,0001$) erhalten hatten, zeigten ein signifikant kürzeres TFS als die Gesamtpopulation.

Eine alleinige Bestimmung dieser Faktoren ist jedoch bekanntermaßen nicht ausreichend um eine exakte, langfristige Risikostratifizierung der einzelnen Patienten durchzuführen, da sich der Großteil der Patienten zum Zeitpunkt der Erstdiagnose im Binet Stadium A befindet und die circa 33% der Patienten mit einer aggressiven Verlaufsform der CLL nicht herausgefiltert werden können (Dighiero, 2003). Aus diesem Grund ist die Bestimmung weiterer etablierter Prognosefaktoren, denen der größte prognostische Einfluss zugesprochen wird, durchgeführt worden.

4.1.2. IgVH-Gen-Mutationsstatus

Bei in etwa der Hälfte aller CLL-Patienten finden sich mutierte IgVH-Gene. Patienten aus der IgVH mutierten Untergruppe haben oft einen relativ benignen klinischen Verlauf der Erkrankung. Damle et al (1999) und Hamblin et al (1999) zeigten in ihren Pionierstudien

einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem IgVH-Gen-Mutationsstatus und dem Krankheitsverlauf, sowie dem Gesamtüberleben bei CLL-Patienten (Damle: Median des OS unmutierte IgVH-Gene vs. mutierte IgVH-Gene: 108 Monate vs. OS nicht erreicht; Hamblin: Median des OS unmutierte IgVH-Gene vs. mutierte IgVH-Gene: 117 Monate vs. 293 Monate). In einer späteren Arbeit konnten sie diesen Zusammenhang auch bei Patienten im Binet Stadium A nachweisen. Der IgVH-Gen-Mutationsstatus war bisher mit den genetischen Aberrationen der stärkste Prognosefaktor. Stilgenbauer et al (2007) zeigten, dass die Inzidenz aller genetischen Aberrationen bei IgVH mutierten und unmutierten gleich ist. Männer sind häufiger von unmutierten IgVH-Genen betroffen (Damle et al, 1999). 45% unserer Patienten zeigten unmutierte IgVH-Gene und somit erwartungsgemäß ein signifikant kürzeres TFS als Patienten mit mutierten IgVH-Genen (TFS: im Median 16 Monate; $P=0,0001$). Dies gilt auch für Patienten im Binet Stadium A und ist somit unabhängig vom Binet Stadium. Sie zeigten hinsichtlich des Binet Stadiums einen schnelleren Progress und erhielten häufiger eine Chemotherapie. Die Verteilung der genetischen Aberrationen unterschied sich nicht. Wie beschrieben zeigten Männer häufiger einen unmutierten IgVH-Status. Vergleicht man das TFS aller etablierten Prognosefaktoren zeigt sich bei Patienten mit unmutiertem IgVH-Status die kürzeste progressionsfreie Zeit von nur 16 Monaten.

4.1.3. CD38-Expression

Als möglicher Ersatz für die Bestimmung des IgVH-Gen-Mutationsstatus gilt die Bestimmung der CD38-Expression. Damle et al (1999) zeigten auch erstmals den prognostischen Einfluss der CD38-Expression bei der CLL. (Median des OS: CD38 negativ vs. CD38 positiv: OS nicht erreicht vs. 120 Monate). Die Höhe der CD38-Expression bleibt bei den meisten Patienten während des Krankheitsverlaufs konstant (Schroers et al, 2005).

Bekanntlich ist die CD38-Expression mit dem IgVH-Status assoziiert, jedoch weichen die Ergebnisse in rund 30% der Fälle ab. 57% der untersuchten Patienten mit einem unmutierten IgVH-Gen-Mutationsstatus waren CD38 positiv. Auch in unserer Untersuchung zeigte sich ein kürzeres progressionsfreies Überleben (TFS: im Median 38 Monate; $P=0,002$) für Patienten mit einem CD38 positivem Anteil von $>30\%$. Patienten mit einer hohen CD38-Expression zeigen einen deutlichen Progress im Binet Stadium ($P=0,001$) und erhielten häufiger eine Chemotherapie ($P<0,001$).

In der multivariaten Datenanalyse zeigte sich eine erhöhte CD38-Expression ($P=0,016$) als unabhängiger Prognosefaktor für das TFS.

Bei Patienten, deren IgVH-Gen-Mutationsstatus bereits bestimmt wurde, konnte keine zusätzliche Information im Hinblick auf das TFS hinzugewonnen werden. Jedoch sollte die

CD38-Expression bei Patienten ohne bekannten IgVH-Status durchgeführt werden, denn die CD38-Expression ist einfach und kostengünstig in Standardlabors zu bestimmen und eignet sich als unabhängiger Prognosefaktor für das TFS.

4.1.4. I-FISH

Die konventionelle Chromosomenbandingtechnik wurde aufgrund ihrer Ungenauigkeit längst von der I-FISH-Untersuchung abgelöst. Abnormitäten konnten bei der konventionellen Technik oft nur in 40-50% der Fälle gefunden werden und obwohl man B-Zell-Mitogene verwendete, stammten die Mitosezellen häufig von nicht leukämischen T-Lymphozyten ab (Autio et al, 1986).

Mit der Entwicklung der I-FISH Untersuchung konnten bei circa 80% der Patienten Chromosomenaberrationen wie Trisomien, Deletionen und Translokationen gefunden werden. Für die Prognose der CLL stellten sich die chromosomalen Aberrationen Deletion 6q-, Deletion 11q-, Deletion 13q-, Deletion 17p- und Trisomie 12 als relevant heraus. In multivariaten Analysen wurden Deletion 11q- und Deletion 17p- bereits als unabhängige Prognosefaktoren der CLL für das progressionsfreie Überleben und das Gesamtüberleben identifiziert (Döhner et al, 1995 und 2000). Allerdings sind bisher bis auf p53 und ATM die beteiligten Tumorsuppressorgene und Onkogene noch nicht bekannt und müssen noch isoliert werden. Eine Deletion 17p- scheint in nur 50% der Fälle auf eine p53-Mutation zurückzuführen zu sein; bei den anderen 50% wird p53 durch andere Mechanismen ausgeschaltet (Zenz et al, 2008).

Patienten mit einem normalen Karyotypen zeigten signifikant seltener einen klinischen Progress ($P=0,033$), wohingegen Patienten mit einer Deletion 17p- im Beobachtungszeitraum von 33 Monaten signifikant häufiger in ein höheres Binet Stadium wechselten ($P=0,017$).

Insgesamt können die Patienten in drei Prognosegruppen eingeteilt werden: Patienten mit einer guten Prognose (normaler Chromosomensatz; monoallelische Deletion 13q-; TFS: im Median >80 Monate), Patienten mit einer mittleren Prognose (Deletion 6q-; Trisomie 12; TFS: im Median 54 Monate) und Patienten mit einer schlechten Prognose (Deletion 11q-; Deletion 17p-; TFS: im Median 38 Monate). Das zusätzliche Vorkommen einer Deletion 11q- oder 17p- zu einer anderen Aberration verschlechtert die Prognose der Patienten.

Die Ergebnisse der Untersuchung der etablierten Prognosefaktoren decken sich zwar größtenteils mit den aktuellen Forschungsergebnissen, dennoch reichen sie für eine exakte Risikostratifizierung nicht aus.

Wie sich im Weiteren herausstellte, sind viele der Patienten, bei denen später Translokationen gefunden werden konnten und die ein schlechtes Outcome hatten, nach den bisherigen Kriterien falsch eingeordnet worden: Nach den Ergebnissen der I-FISH Untersuchung waren 66% von ihnen fälschlicherweise in die Gruppe der Patienten mit einer guten oder mittleren Prognose eingeordnet worden, 70% von ihnen sind CD38 negativ und 35% befinden sich im Binet Stadium A. Die Ursache für den schlechten Krankheitsverlauf ist unklar.

4.2. Analyse der M-FISH Untersuchung und deren Einfluss auf die Prognose

Die CLL-Zellen wurden auch mit M-FISH untersucht, einer zytogenetischen Methode, die eine detaillierte Analyse des kompletten Chromosomensatzes möglich macht. Lange Zeit ging man davon aus, dass eine derartige Analyse in der Praxis nicht durchführbar sei, da sie mit der klassischen B-Zell-Mitogenstimulation sehr zeitaufwendig ist.

Durch die Stimulation mit CD40 Ligand oder CpG-ODN konnten bei 94% der Patienten Aberrationen gefunden werden. Das ist mehr als doppelt so häufig als bei konventionellen Chromosomenbanding-Untersuchungen nach einer Stimulation mit den herkömmlichen B-Zell-Mitogenen (Juliussen et al, 1990) und auch circa 10% häufiger im Vergleich zur I-FISH Untersuchung (Döhner et al, 2000).

Da die Aberrationen auch bei unstimulierten Zellen beziehungsweise bei Stimulation mit einem anderen Stimulationsprotokoll gefunden werden konnten, sind sie nicht durch die Stimulationstechnik bedingt, sondern stellen tatsächliche in-vivo-Bedingungen dar.

Neben normalen Karyotypen (26%) und den bei der CLL geläufigen Aberrationen (Döhner et al, 1999; Stilgenbauer et al, 2002) wie Deletionen (Del6q21, Del8q-, Del11q22-25, Del13q14, Del17p13) und Trisomien (Trisomie 12), die sich auch im I-FISH darstellen lassen, fanden sich zahlreiche andere Aberrationen, wie Insertionen, Inversionen und Translokationen, die bisher bei der CLL keine prognostische Rolle spielten.

Die an den Bruchpunkten betroffenen Genloki könnten noch unbekannte Tumorsuppressorgene und Onkogene beherbergen. Aberrationen konnten auf allen Chromosomen gefunden werden. Es fanden sich bei 23% der Patienten Translokationen, die im Weiteren genauer untersucht wurden.

4.2.1. Translokationen

Bei 23% der untersuchten Patienten konnten Translokationen gefunden werden. 45% der Translokationen waren balanciert, 55% unbalanciert. Da es zwischen diesen beiden Gruppen keinen signifikanten Unterschied gab, wurden sie als eine Gruppe zusammengefasst ($P=0,882$). Die Anzahl der gefundenen Translokationen spielt für die Prognose keine Rolle ($P=0,162$). Die Translokationen wurden unabhängig davon gefunden, ob die Erkrankung gerade erst diagnostiziert worden war, schon ein längerer Krankheitsverlauf vorlag (>120 Monate; $P=0,353$), die Patienten therapienaiv waren, oder bereits eine Chemotherapie erhalten hatten ($P=0,925$). Sie werden somit als primäre Chromosomenveränderungen gesehen, die bereits früh in der Lymphomentwicklung auftreten, und nicht sekundär im Rahmen der klonalen Evolution während des Tumorprogresses oder durch eine Chemotherapie entstehen.

Auch war das Alter der Patienten nicht relevant, jedoch das Geschlecht. Bei Männern konnten Translokationen häufiger gefunden werden ($P=0,011$), ebenso wie bei Patienten mit positivem CD38-Status ($P=0,018$). Außerdem zeigte sich, dass Translokationen bei Patienten im Binet Stadium B und C signifikant häufiger auftraten ($P=0,038$).

Anders als bei Mayr et al (2004) beschrieben, konnten bei unseren Patienten mit einer bekannten Deletion im I-FISH nicht häufiger Translokationen nachgewiesen werden. Insbesondere eine Del 17p-, die mit 37% die häufigste bei Patienten mit Translokationen gefundene Aberration im I-FISH war, konnte bei den betroffenen Patienten nicht signifikant vermehrt gefunden werden ($P=0,076$).

Es konnte keine CLL spezifische Translokation gefunden werden. Das entspricht auch den schon früher gemachten Untersuchungsergebnissen (Mayr et al, 2004, 2006).

Die Mehrzahl der Translokationen wurde zuvor noch nicht bei CLL-Patienten beschrieben und sie traten nicht wiederholt auf.

Bei zwei Patienten konnte eine Translokation $t(14;18)(q32;q21)$ gefunden werden. Diese Translokation involviert sowohl den Ort der Immunglobulinschwerketten (IgH), als auch den BCL2-Locus. Diese Translokation findet man bei der CLL selten, häufiger aber bei follikulären Non-Hodgkin-Lymphomen mit indolentem Verlauf.

Es fiel auf, dass die meisten der 107 Bruchpunkte bereits mit anderen Partnerchromosomen beschrieben wurden. Bekanntlich kommt es an den Translokationsbruchpunkten zu kleinsten Deletionen. An diesen Stellen befinden sich Gene, die für die Tumorgenese oder den Krankheitsprogress verantwortlich sind. Eine hochauflösende Darstellung der Bruchpunkt-Cluster könnte in Zukunft die Identifikation solcher Gene vereinfachen.

23% der Bruchpunkte fanden sich an Stellen, die bei der CLL als Deletionsstellen bekannt sind (Döhner et al, 1999; Stilgenbauer et al, 2002). Am häufigsten waren hier 13q14 (9%), 14q32 (4%; IgH) und 11q22-25 (3%) vertreten. Die Immunglobulin-Loci waren in 6% der Fälle betroffen. Der Mitbeteiligung des IgH-Lokus an einer Translokation wird eine schlechte Prognose zugeschrieben (Haferlach C, 2010).

20% der Bruchpunkte fanden sich an bei anderen Lymphomen/ Leukämien bekannten Genloci. Am häufigsten wurden in je 5% der Fälle Translokationsbruchpunkte bei 1p32-36 und bei 18q21(=BCL2-Locus, Proto-Onkogen) gefunden.

Andere bei der CLL beschriebene Translokationsstellen wie 2q22, 3q27 (=BCL6 Genloкус, Protoonkogen; Ye et al, 1995; Sahota et al, 2000), 6(p21p25), 6(p11p12) oder t(14;19)(q32;q13) (=IgH, BCL-3) wurden in unserem Patientenkollektiv nicht gefunden. Insgesamt waren bei 94% der Patienten bekannte Bruchpunkte an den Aberrationen beteiligt.

Mayr et al konnten 2004 und 2006 an einer kleineren Patientengruppe den schlechten prognostischen Einfluss der Translokationen nachweisen (TFS: im Median 24 Monate vs. 106 Monate; OS: im Median 94 Monate vs. 346 Monate), unabhängig davon, um welche Translokation es sich handelt.

In unserem Patientenkollektiv konnte dies bestätigt werden: es zeigte sich, dass Patienten mit Translokationen eine schlechtere Prognose im progressionsfreien Überleben haben, als solche ohne Translokationen (TFS: im Median 46 Monate vs. 89 Monate; P=0,002).

Im Vergleich sieht man, dass die Patienten mit Translokationen ein ebenso kurzes TFS haben wie zum Beispiel Patienten mit einer hohen CD38-Expression, einer Deletion 11q- oder einer Deletion 17p- (TFS: im Median 46 Monate vs. 38 Monate; P=0,365) und somit mit einer schlechten Prognose vergesellschaftet sind.

Erste Untersuchungen an CLL-Patienten mit Translokationen zeigten auch ein schlechtes Therapieansprechen (Van Den Neste, 2007).

CD38 positive Patienten und Patienten im Binet Stadium B/ C stellen eine Subgruppe der Patienten mit Translokationen dar. Diese Prognosefaktoren beeinflussen das TFS ebenfalls negativ. Allerdings waren nur 30% der Patienten mit Translokationen CD38 positiv, 35% befanden sich im Binet Stadium B, 30% im Binet Stadium C. Somit wären ohne die M-FISH Analyse diese Patienten mit negativem CD38-Status und die Patienten im Binet A Stadium zu gut eingeschätzt worden.

Es zeigte sich, dass mit dem Nachweis von Translokationen Patienten identifiziert werden können, die nach der Bestimmung der etablierten Prognosefaktoren vor allem im frühen Krankheitsstadium in eine falsche Prognosegruppe eingeordnet worden wären.

4.2.2. Komplex aberrante Karyotypen

Bei Patienten mit akuter myeloischen Leukämie (AML) konnte gezeigt werden, dass ein komplex aberranter Karyotyp einen negativen Einfluss auf die Prognose hat (OS: Median < 6 Monate; Schoch et al, 2001 und 2002). Die Ansammlungen numerischer und struktureller Aberrationen entstehen vermutlich durch Ausfälle der DNA-Reparaturmechanismen und eine fehlerhafte Überwachung der Zellzyklusfunktionen. In 80% der Fälle konnten bei diesen Patienten TP53-Mutationen gefunden werden (Schoch et al, 2005).

Mayr et al (2006) belegten diesen schlechten prognostischen Einfluss bei einer kleinen Gruppe von CLL-Patienten. Haferlach C. et al (2007) fanden in einer großen Patientengruppe bei 16% der untersuchten CLL-Patienten einen komplex aberranten Karyotypen.

Komplex aberrante Karyotypen konnte in unserer Untersuchung bei 27 Patienten (22%) gefunden werden. Es konnten Deletionen, Inversionen, Insertionen, Trisomien und balancierte, sowie unbalancierte Translokationen gefunden werden. Die Spannweite der Aberrationen reicht von 3-18 pro Metaphase. Sie konnten, ebenso wie die Translokationen, unabhängig davon gefunden werden, ob die Erkrankung neu diagnostiziert worden war, bereits ein längerer Krankheitsverlauf vorlag (>120 Monate; $P=0,387$), die Patienten therapienaiv waren, oder bereits eine Chemotherapie erhalten hatten ($P=0,875$).

Im Vergleich mit anderen Prognosefaktoren zeigte sich ein gehäuftes Vorkommen von komplex aberranten Karyotypen bei Patienten mit einem positiven CD38-Status ($P=0,024$). Sie hatten eine sehr schlechte Prognose mit einem TFS von 18 Monaten im Median ($P=0,002$). Jedoch konnten auch bei CD38 negativen Patienten (72%) komplex aberrante Karyotypen mit einem schlechten TFS gefunden werden.

Komplex aberrante Karyotypen waren nicht mit laborchemischen Prognosefaktoren, dem Alter ($P=0,891$) oder dem Geschlecht ($P=0,982$) der Patienten assoziiert. Im Vergleich mit den anderen Prognosefaktoren zeigte sich, dass sie bei einem höheren Binet Stadium nicht signifikant häufiger auftraten ($P=0,084$).

18 (66%) Patienten mit komplex aberranten Karyotyp hatten in der I-FISH Untersuchung bereits nachgewiesene Deletionen oder Trisomien die sich im M-FISH bestätigten. Eine Deletion 17p- trat bei Patienten mit Translokationen und einem komplex aberranten Karyotypen in 28% der Fälle auf, bei Patienten ohne Translokationen und komplex

aberranten Karyotyp sogar in 60%. Ein vermehrtes Vorkommen von TP53-Mutationen ist bei Patienten mit komplex aberranten Karyotypen bereits bei der CLL beschrieben worden (Dicker, 2009). Bei der AML bekannte unbalancierte Translokationen von 7q- und 17p- bei Patienten mit komplex aberranten Karyotypen wurden bei 15% der Patienten gefunden. Diese Patienten zeigten eine genomische Instabilität und eine schlechte Prognose (Schoch, 2005).

Die Ergebnisse unseres Patientenkollektives bestätigen, dass Patienten mit einem komplex aberranten Karyotypen, ebenso wie Patienten mit Translokationen, eine Subpopulation mit einer schlechten Prognose für das TFS sind. (TFS: im Median 46 Monate vs. 89 Monate; $P=0,002$).

Da 17 (63%) der Patienten mit komplex aberranten Karyotypen auch Translokationen haben, stellt sich die Frage, ob das schlechte TFS bei einem Vorkommen von Translokationen nur ein Epiphänomen ist. In diesem Fall käme es letztendlich nur auf die Gesamtzahl der Aberrationen an, die die schlechte Prognose verursachen. Das Vorkommen von Translokationen als solche hätte keine prognostische Bedeutung. Diese Vermutung konnte jedoch widerlegt werden, da 37% der Patienten mit Translokationen keinen komplex aberranten Karyotypen aufweisen und sie ebenfalls ein signifikant kürzeres TFS haben ($P=0,007$). Patienten mit einem komplex aberranten Karyotypen unterscheiden sich im TFS nicht durch das zusätzliche Vorkommen von Translokationen (Median des TFS bei komplex aberrantem Karyotyp mit Translokationen: 30 Monate; Median des TFS bei komplex aberrantem Karyotyp ohne Translokationen: 28 Monate)

Neueste Untersuchungen zeigen, dass Patienten mit einem unauffälligen I-FISH Befund und dem Nachweis komplex aberranter Karyotypen in der Chromosomenanalyse ein kürzeres TFS und OS hatten, als Patienten mit einem unauffälligen I-FISH und normalem Chromosomensatz (Rigolin et al, 2012). In unserem Patientekollektiv konnte bei 6% der Patienten mit komplex aberrantem Karyotyp ein unauffälliger Befund im I-FISH gefunden werden.

In der multivariaten Analyse haben komplex aberrante Karyotypen den größten Einfluss auf die Prognose ($P=0,003$) in Bezug auf das TFS und sind vollkommen unabhängig von den anderen erhobenen klinischen Markern. Dieses Ergebnis ist auch unabhängig davon, ob die Patienten bereits eine Chemotherapie erhalten haben oder nicht ($P=0,002$).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das Vorhandensein von Translokationen und von komplex aberranten Karyotypen eine neue prognostische Untergruppe definiert. Die betroffenen Patienten haben ein signifikant kürzeres TFS und somit eine schlechtere

Prognose. Ein großer Teil der Patienten wäre mit der alleinigen Bestimmung der herkömmlichen Prognosefaktoren falsch eingeordnet worden.

Komplex aberrante Karyotypen stellen einen neuen, vom klinischen Stadium unabhängigen Prognosefaktor für das progressionsfreie Überleben dar, der schon im Frühstadium der Erkrankung eine Risikoeinschätzung für den einzelnen Patienten erlaubt.

Somit ist die zusätzliche Untersuchung der Patienten mit der M-FISH Methode zu den herkömmlichen Markern wie Binet Stadium, IgVH-Gen-Mutationsstatus, CD38-Expression und I-FISH Analyse durchaus sinnvoll, um die Prognose des Einzelnen schon bei Krankheitsbeginn besser bestimmen zu können und den Betroffenen eine suffiziente Chemotherapie oder bei Hochrisikopatienten gegebenenfalls eine Hochdosistherapie mit anschließender Stammzelltransplantation anbieten zu können.

5. Zusammenfassung

Die B-CLL ist die häufigste Leukämie des Erwachsenen und hat sehr unterschiedliche Verlaufsformen. In den vergangenen Jahren gab es zwar große Fortschritte in Hinsicht auf die Risikostratifizierung bei CLL-Patienten, jedoch konnte bisher trotz der Etablierung verschiedener klinischer, serologischer, immunologischer und zytogenetischer Einzelfaktoren noch kein ausreichendes Risikoprofil erstellt werden, um eine optimale, risikoadaptierte Therapie für den einzelnen Patienten zu finden.

In der vorliegenden Arbeit wurde bei insgesamt 146 CLL-Patienten die prognostische Aussagekraft, sowohl von etablierten Prognosefaktoren, als auch die der neuen zytogenetischen Prognosefaktoren bei vor allem therapienaiven Patienten zum Zeitpunkt der Erstdiagnose untersucht.

Neben den klinischen Daten wurden das Binet Stadium, der IgVH-Gen-Mutationsstatus und die molekularen Marker, wie die CD38- und ZAP-70-Expression, sowie die chromosomalen Aberrationen Deletion 6q-, 11q-, 13q-, 17p- und Trisomie 12 zur Vorhersage der Prognose bestimmt. Die Ergebnisse decken sich größtenteils mit den aktuellen Forschungsergebnissen, reichen aber für eine exakte Risikostratifizierung nicht aus, da ein Großteil der Patienten fälschlicherweise in eine gute oder mittlere Prognosegruppe eingeordnet wurde.

Um eine detaillierte Chromosomenanalyse mit M-FISH durchführen zu können, wurden die CLL-Zellen mit CD40 Ligand (CD40 Ligand) oder CpG-Oligodeoxynukleotiden (CpG-ODN) und Interleukin-2 (IL-2) stimuliert. Bei 31 von 134 CLL-Patienten (23%) konnten Translokationen gefunden werden. In 94% waren bei Lymphomen/ Leukämien bekannte Bruchpunkte an den Aberrationen beteiligt. Zusätzlich zeigte die M-FISH Analyse zahlreiche weitere Aberrationen. 27 von 122 untersuchten Patienten (22%) zeigten einen komplex aberranten Karyotypen mit drei oder mehr Aberrationen.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass Patienten mit Translokationen oder mit einem komplex aberranten Karyotypen im Gegensatz zu den restlichen Patienten ein verkürztes progressionsfreies Überleben (TFS: 46 Monate vs. 89 Monate; $P=0,002$) und somit eine schlechtere Prognose haben. Sie definieren eine neue prognostische Untergruppe.

In der univariaten Datenanalyse zeigt sich, dass ein zusätzliches Vorkommen von komplex aberranten Karyotypen die ansonsten günstige Prognose von Patienten mit einer Deletion 6q- (TFS: 37 Monate vs. 96 Monate; $P=0,016$) oder Deletion 13q- (TFS: 38 Monate vs. 85 Monate; $P=0,0001$) verschlechtert.

Zusammenfassung

Eine multivariate Analyse, die die Faktoren Binet Stadium, CD38-Expression, Deletion 17p- und Translokationen einschließt zeigt, dass sich ein komplex aberranter Karyotyp als unabhängiger Prognosefaktor für das progressionsfreie Überleben eignet ($P=0,002$). Diese Daten können für das risikoadaptierte klinische Management der CLL-Patienten hinzugezogen werden und Patienten mit einer schlechten Prognose bereits zum Zeitpunkt der Erstdiagnose herausfiltern.

6. Literaturverzeichnis

Autio K, Elonen E, Teerenhovi L, Knuutila S. „Cytogenetic and immunologic characterization of mitotic cells in chronic lymphocytic leukemia“. European Journal of Haematologie 1986; 39: 289-298

Azofeifa J, Fauth C, Kraus J, Maierhofer C, Langer S, Bolzer A, Reichman J, Schufferhauer S, Speicher MR. „An optimized probe set for the detection of small interchromosomal aberrations by use of 24-color FISH“. American Journal of Human Genetics 2000; 66: 1684-1688

Buhmann R, Nolte A, Westhaus D, Emmerich B, Hallek M. „CD40-activated B-cell chronic lymphocytic leukemia cells for tumor immunotherapy: stimulation of allogeneic versus autologous T cells generates different types of effector cells“. Blood 1999; 93: 1992-2002

Buhmann R, Kurzeder C, Rehklaue J, Westhaus D, Bursch S, Hiddemann W, Haferlach T, Hallek M, Schoch C. „CD40L stimulation enhances the ability of conventional metaphase cytogenetics to detect chromosome aberrations in B-cell chronic lymphocytic leukaemia cells“. British Journal of Haematology 2002; 118: 968-975

Binet JL, Auquier A, Dighiero G, Chastang C, Piquet H, Goasquen J, Vaugier G, Potron G, Colona P, Oberling P, Thomas M, Tchernia G, Jacquillat C, Boivin P, Lesty C, Duault MT, Monconduit M, Belabbes S, Gremy F. „A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis“. Cancer 1981; 48: 198-204

Binet JL, Caligaris-Cappio F, Catovsky D, Cheson B, Davis T, Dighiero G, Döhner H, Hallek M, Hillmen P, Keating M, Montserrat E, Kipps TJ, Rai KR. „Perspectives on the use of new diagnostic tools in treatment of chronic lymphocytic leukemia“. Blood 2006; 107: 859-861

Cartwright RA, Bernard SM, Bird CC, Darwin CM, O'Brien C, Richards ID, Roberts B, McKinney PA. „Chronic lymphocytic leukaemia: case control epidemiological study in Yorkshire“. British Journal of Cancer 1987; 56: 79-82

Catovsky D, Fooks J, Richards S. „Prognostic factors in chronic lymphocytic leukemia: the importance of age, sex and response to treatment in survival. A report from the MRC CLL1 trial“. British Journal of Haematology 1986; 72: 141-149

Chen L, Widhopf G, Huynh L, Rassenti L, Rai KR, Weiss A, Kipps TJ. „Expression of ZAP-70 is associated with increased B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia”. *Blood* 2002; 100: 4609-4614

Cheson BD, Bennett JM, Grever M, Kay N, Keating MJ, O`Brian S, Rai RK. „National Cancer Institute-sponsored Working Group guidelines for chronic lymphocytic leukemia: revised guidelines for diagnostic and treatment”. *Blood* 1996; 87: 4990-4997

Chiorazzi N, Ferrarini M. „B-cell chronic lymphocytic leukemia: Lessons learned from studies of the B-cell antigen receptor”. *Annual review of immunology* 2003; 21: 841-894

Constantinides IP; Pathouli C, Karvountzis G, Papadopoulos P, Varvoutsis-Constantinides M, Eliakis P, Hadziyannis S, Komninos Z. „Serum beta 2 microglobulin in malignant lymphoproliferative disorders”. *Cancer* 1985; 55: 2384-2389

Crespo M, Bosch F, Villamor N, Bellosillo B, Colomer D, Rozman M, Marcé S, López-Guillermo A, Campo E, Montserrat E. „ZAP-70 expression as a surrogate for Immunoglobulin-variable-region mutations in chronic lymphocytic leukemia”. *New England Journal of Medicine* 2003; 348: 1764-1775

Cunningham BA, Berggard I. „Structure, evolution and significance of beta2-microglobulin”. *Transplantation Reviews* 1974; 21: 3-14

Cuttner J. „Increased incidence of hematologic malignancies in first-degree relatives of patients with chronic lymphocytic leukemia”. *Cancer Investigations* 1992; 10: 103-109

Cuttner J, Spiera H, Troy K, Wallenstein S. „Autoimmune disease is a risk factor for the development of non-Hodgkin`s lymphoma”. *Journal of Rheumatologie* 2005; 32: 1866-1867

Damle RN, Wailly T, Fais F, Ghiotto F, Valetto A, Allen SL, Buchbinder A, Budman D, Dittmar K, Kolitz J, Lichtman SM, Schulman P, Vinciguerra VP, Rai KR, Ferrarini M, Chiorazzi N. „IgV gene mutation status and CD38 expression as a novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia”. *Blood* 1999; 94: 1840-1847

Damle RN, Ghiotto F, Valetto A, Albesiano E, Fais F, Yan X-J, Sison CP, Allen SL, Kolitz J, Shulman P, Vinciguerra VP, Budde P, Frey J, Rai KR, Ferrarini M, Chiorazzi N. „B-cell chronic lymphocytic leukemia cells express a surface membrane phenotype of activated, antigen-experienced B lymphocytes”. *Blood* 2002; 99: 4087-4093

Decker T, Schneller F, Kronschnabel M, Dechow T, Lipford GB, Wagner H, Peschel C. „Immunostimulatory CpG-oligonucleotides induce functional high affinity IL-2 receptors on B-CLL cells: Costimulation with IL-2 results in a highly immunogenic phenotype”. *Experimental Hematology* 2000; 28: 558-568

Decker T, Schneller F, Sparwasser T, Tretter T, Lipford GB, Wagner H, Peschel C. „Immunostimulatory CpG-oligonucleotides cause proliferation, cytokine production, and an immunogenic phenotype in chronic lymphocytic leukemia B cells”. *Blood* 2000; 95: 999-1006

Dicker F, Herholz H, Schnittger S, Nakao A, Patten N, Wu L, Kern W, Haferlach T, Haferlach C. „The detection of TP53 mutations in chronic lymphocytic leukemia independently predicts rapid disease progression and is highly correlated with a complex aberrant karyotype”. *Leukemia* 2009 Jan; 23(1): 117-24. Epub 2008 Oct.8

Diehl LF, Karnell LH, Menck HR. „The National Cancer Data Base Report on age, gender, treatment and outcomes of patients with chronic lymphocytic leukemia”. *Cancer* 1999; 86: 2684-2692

Dighiero G. „Unsolved issues in CLL biology and management” *Leukemia* 2003 Dec; 17(12): 2385-91

Döhner H, Fischer K, Bentz M, Hansen K, Benner A, Cabot G, Diehl D, Schlenk R, Coy J, Stilgenbauer S, Volkmann M, Galle PR, Poustka A, Hunstein W, Lichter P. „p53 gene deletion predicts for poor survival and non response to therapy with purine analogs in chronic B-cell leukemias”. *Blood* 1995; 6: 1580-1589

Döhner H, Stilgenbauer S, Benner A, Leupolt E, Krober A, Bullinger L, Döhner K, Bentz M, Lichter P. „Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia.” *New England Journal of Medicine* 2000; 343:1910-1916.

Dongen van JJM, Langerak AW, Brüggemann M, Evans PAS, Hummel M, Lavender FL, Delabesse E, Davi F, Schuurin E, Garcia-Sanz R, Krieken va JHJm, Droese J, Gonzalez D, Bastard C, White HE, Spaargaren M, Gonzalez M, Parreira A, Smith JL, Morgan GJ, Kneba M, Macintyre EA. „Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: Report of the BIOMED-2 concerted action BMH4-CT98-3936“. Leukemia 2003; 17: 2257-2317

Döhner H, Stilgenbauer S, James MR, Benner A, Weilguni T, Bentz M, Fischer K, Hunstein W, Lichter P. „11q deltions identify a new subset of B-cell chronic lymphocytic leukemia characterized by extensive nodal involvement and inferior prognosis“. Blood 1997; 89: 2516-2522

Döhner H, Stilgenbauer S, Döhner K, Bentz M, Lichter P. „Chromosome aberrations in B-cell chronic lymphocytic leukemia: reassessment based on molecular cytogenetic analysis“. J Mol Med. 1999 Feb; 77(2): 266-81

Döhner H, Stilgenbauer S, Benner A, Leupolt E, Kröber A, Bullinger L, Döhner K, Bentz M, Lichter P. „Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia“. New England Journal of Medicine 2000; 343: 1910-1916

Duberg AS, Nordström M, Törner A, Reichard O, Strauss R, Janzon R, Bäck E, Ekdahl K. „Non-Hodgkin`s lymphoma and other nonhepatic malignancies in Swedish patients with hepatitis C virus infection“. Hepathology 2005; 41: 652-659

Dührig J, Nückel H, Cremer M, Führer A, Halfmeyer K, Fandrey J, Mörröy T, Klein-Hitpass L, Dührsen U. „ZAP-70 expression is a prognostic factor in chronic lymphocytic leukemia“. Leukemia 2003; 17: 2426-2434

Dyer MJS, Oscier DG. „The configuration of the immunoglobulin genes in B cell chronic lymphocytic leukemia“. Leukemia 2002; 16: 973-984

Eils R, Uhrig S, Saracoglu K, Sälzer K, Bolzer A, Petersen I, Chassery J, Ganser M, Speicher MR. „An optimized, fully automated system for fast and accurate identifiation of chromosomal rearrangements by multiplex-FISH (M-FISH)“. Cytogenetics and Cell Genetics 1998; 82: 160-171

Fialkow PJ, Najfeld V, Reddy AC, Singer J, Steinmann L. „Chronic lymphocytic leukemia: Clonal origin in a committed B-lymphocyte progenitor“. Lancet 1978; 2: 444-446

Fitchett M, Griffiths MJ, Oscier DG, Johnson S, Seabright M. „Chromosome abnormalities involving band 13q14 in hematologic malignancies“. Cancer Genet Cytogenet 1987; 24: 143-150

Galton DA. „The pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia“. Can Med Assoc J 1966; 94: 1005-1010

Gharagozloo S, Khoshnoodi J, Shokri F. „Hepatitis C virus Infection in Patients with essential mixed cryoglobulinemia, multiple myeloma and chronic lymphocytic leukemia“. Pathology Oncology Research 2001; 7: 135-139

Ghiotto F, Fais F, Albesiono E, Sison C, Valetto A, Gaidano G, Reinhardt J, Kolitz JE, Rai K, Allen SL, Ferrarini M, Chiorazzi N. „Similarities and differences between the light and heavy chain Ig variable region gene repertoires in chronic lymphocytic leukemia“. Molecular medicine 2006; 12: 300-308

Gopen GD, Swan JA. „The science of scientific writing“. American scientist 1990; 78: 550-558

Haferlach C, Dicker F, Schnittger S, Kern W, Haferlach T. „Comprehensive genetic characterization of CLL: a study on 506 cases analysed with chromosome banding analysis, interphase FISH, IgV(H) status and immunophenotyping“. Leukemia 2007 Dec; 21(12): 2442-51. Epub 2007 Sep 6.

Haferlach C, Dicker F, Weiss T, Schnittger S, Beck C, Grote-Metke A, Oruzio D, Kern W, Haferlach T. „Toward a comprehensive prognostic scoring system in chronic lymphocytic leukemia based on a combination of genetic parameters“. Genes Chromosomes Cancer 2010 Sept; 49(9): 851-9

Hallek M, Wanders L, Strohmeyer S, Emmerich B. „Thymidine kinase: A tumor marker with prognostic value for non-Hodgkin's lymphoma and a broad range of potential clinical applications“. Annals of Hematology 1992; 65: 1-5

Hallek M, Wanders L, Ostwald M, Busch R, Senekowitsch R, Stern S, Schick HD, Kuhn-Hallek I, Emmerich B. „Serum beta(2)-microglobulin and serum thymidine kinase are independent predictors of progression free survival in chronic lymphocytic leukemia and immunocytoma“. *Leukemia and Lymphoma* 1996; 22: 437-447

Hallek M, Langenmayer I, Nerl C, Knauf C, Dietzfelbringer H, Adorf D, Ostwald M, Busch R, Kuhn-Hallek I, Thiel E, Emmerich B. „Elevated serum thymidine kinase levels identify a subgroup of high risk of disease progression in early, nonsmouldering chronic lymphocytic leukemia“. *Blood* 1999; 93: 1732-1737

Hallek M, Emmerich B. „Chronische lymphatische Leukämie/lymphoplasmozytoides Lymphom“. In: Schmoll HJ, Höffken K, Possinger K. „Kompendium Internistische Onkologie: Standards in Diagnostik und Therapie, Teil 2“. Springer 2006; Auflage 4: 2845-2886

Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, Caligaris-Cappio F, Dighiero G, Döhner H, Hillmen P, Keating MJ, Montserrat E, Rai KR, Kipps TJ. „Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines“. *Blood* 2008; 111: 5446-5456

Hamblin TJ. „Trisomy 12 in CLL research“. *Leukemia Research* 1997; 21: 1025-1026

Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner A, Oscier DG, Stevenson FK. „Unmutated Ig V_H genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia“. *Blood* 1999; 94: 1848-1854

Hamblin TJ. „Historical Review: Historical aspects of chronic lymphocytic leukemia“. *British Journal of Haematology* 2000; 111: 1023-1034

Juliusson G, Oscier DG, Fitchett M, Ross FM, Stockdill G, Macki MJ, Parker AC, Castoldi GL, Guneo A, Knuutila S. „Prognostic subgroups in B-cell chronic lymphocytic leukemia defined by specific chromosomal abnormalities“. *New England Journal of Medicine* 1990; 323: 720-724

Kay NE, Jelinek DF. „B-CLL: Is the enigma of disease heterogeneity about to be revealed?“. *Blood* 2002; 100: 1110-1111

Keating MJ. „Chronic lymphocytic leukemia“. Seminars in Oncology 1999; 26: 107-114

Lee JS, Dixon DO; Kantarjian HM, Keating MJ, Talpaz M. „Prognosis of chronic lymphocytic leukemia: a multivariate regression analysis of 325 untreated patients“. Blood 1987; 96: 929-936

Mauro FR, Foa R, Giannarelli D, Cordone I, Crescenzi S, Pescarmona E, Sala R, Ceretti R, Mandelli F. „Clinical characteristics and outcome of young chronic lymphocytic leukemia patients: a single institution study of 204 cases“. Blood 1999; 94: 448-454

Mauro FR, Foa R, Cerretti R, Giannarelli D, Coluzzi S, Mandelli F, Girelli G. „Autoimmune haematolytic anemia in chronic lymphocytic leukemia: Clinical, therapeutic and prognostic features“. Blood 2000; 95: 2786-2792

Mayr C, Schoch C, Kofler D.M., Busch R, Hallek M, Wendtner C.-M. „High incidence of new translocations in B-CLL detected by CD40L-enhanced cytogenetics (CEC): A new prognostic marker for infavorable survival outcome in patients with B-CLL“. Journal of Clinical Oncology, 2004 ASCO Annual Meeting Proceedings (Post-Meeting Edition). Vol 22, No 14S (July 15 Supplement), 2004: 6561

Mayr C, Speicher MR, Kofler DM, Buhmann R, Strehl J, Busch R, Hallek M, Wendtner C-M. „Chromosomal translocations are associated with poor prognosis in chronic lymphocytic leukemia“. Blood 2006; 107: 742-751

Mitelman F. „ISCN 1995: An international system for human cytogenetic nomenclature (1995)“. S. Karger, Basel

Montserrat E, Sanchez-Bisono J, Vinolas N, Rozman C. „Lymphocyte doubling time in chronic lymphocytic leukemia: analysis of its prognostic significance“. British Journal of Hematology 1986; 62: 567-575

Montserrat E, Vinolas N, Reverter JC, Rozman C. „Natural history of chronic lymphocytic leukemia: on the Progression and prognosis of early clinical stages“. Nouvelle Revue Francaise d'Hématologie 1988; 30: 359-361

Nishiyama H, Mokuno J, Inoe T. „Relative frequency and mortality rate of varoius types of leukemia in Japan“. Japanese Journal of Cancer Research 1969; 60: 71-81

Oscier DG, Gardiner AC, Mould SJ, Glide S, Davis ZA, Ibbotson RE, Corcoran MM, Chapman RM, Thomas PW, Copplestone JA, Orchard JA, Hamblin TJ. „Multivariate analysis of prognostic factors in CLL: clinical stage, IGVH gene mutational status, and loss or mutation of the p53 gene are independent prognostic factors“. Blood 2002, 100: 1177-1184

Rai KR, Sawitsky A, Cronkite EP, Chanana AD, Levy RN, Pasternack BS. „Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia“. Blood 1975; 46: 219-234

Rassenti LZ, Huynh L, Toy TL; Chen L, Keating MJ, Gribben JG, Neuberg DS, Flinn IW, Rai KR, Byrd JC, Kay NE, Greaves A, Weiss A, Kipps TJ. „ZAP-70 compared with immunoglobulin heavy-chain gene mutation status as a predictor of disease progression in chronic lymphocytic leukemia“. New England Journal of Medicine 2004; 351: 893-901

Rigolin GM, Cibien F, Martinelli S, Formigaro L, Rizzotto L, Tammiso E, Saccenti E, Bardi A, Cavazzini F, Ciccone M, Nichele I, Pizzolo G, Zaja F, Fanin R, Galieni P, Dalsass A, Mestichelli F, Testa N, Negrini M, Cuneo A. „Chromosome aberrations detected by conventional karyotyping using novel mitogens in chronic lymphocytic leukemia with „normal“ FISH: correlations with clinicobiologic parameters“. Blood 2012 Mar 8; 119(10):2310-3. Epub 2012 Jan 13

Rosenwald A, Alizadeh AA, Widhopf G, Simon R, Davis RE, Yu X, Yang L, Pickeral OK, Rassenti LZ, Powell J, Botstein D, Byrd JC, Grever MR, Cheson BD, Chiorazzi N, Wilson WH, Kipps TJ, Brown PO, Staudt LM. „Relation of gene expression phenotype to immunoglobulin mutation genotype in B cell chronic lymphocytic leukemia“. Journal of experimental medicine 2001; 194: 1639-164

Rozman C, Montserrat E, Rodriguez-Fernandez JM, Ayats R, Vallespi T, Parody R, Rios A, Morey M, Gomis F, Akala A, Gutierrez M, Maldonado J, Gonzalez C, Giralto M, Hernandez-Metz, Cabrera A, Fernandez-Ranada JM. „Bone marrow histologic pattern- the best single prognostic parameter in chronic lymphocytic leukemia: a multivariate survival analysis of 329 cases“. Blood 1984; 64: 642-648

Safati M, Chavret S, Chastang C, Biron G, Strykmans P, Delespesse G, Binet JL, Merle-Beral H, Bron D. „Prognostic importance of serum soluble CD23 level in chronic lymphocytic leukemia“. Blood 1977; 50: 1049-1059

Sahota SS, Davis Z, Hamblin TJ, Stevenson FK. „Somatic mutations of bcl-6 genes can occur in the absence of V(H) mutations in chronic lymphocytic leukemia”. *Blood* 2000; 95: 3534-3540

Schoch C, Haferlach T, Haase D, Fonatsch C, Löffler H, Schlegelberger B, Staib P, Sauerland MC, Heinecke A, Büchner T, Hiddemann W, German AML Cooperative Study Group. „Patients with de novo acute myeloid leukaemia and complex karyotype aberrations show a poor prognosis despite intensive treatment: a study of 90 patients”. *British Journal of Haematology* 2001; 112(1): 118-126

Schoch C, Haferlach T, Bursch S, Gerstner D, Schnittger S, Dugas M, Kern W, Löffler H, Hiddemann W. „Loss of genetic material is more common than gain in acute myeloid leukemia with complex aberrant karyotype: a detailed analysis of 125 cases using conventional chromosome analysis and fluorescence in situ hybridization including 24-color FISH”. *Genes Chromosomes Cancer* 2002; 35(1): 20-29

Schoch C, Kern W, Kohlmann A, Hiddemann W, Schnittger S, Haferlach T. „Acute myeloid leukemia with a complex aberrant Karyotype is a distinct biological entity characterized by genomic imbalances and a specific gene expression profil”. *Genes Chromosomes Cancer* 2005 Jul; 43(3):227-38

Schroers R, Griesinger F, Trümper L, Haase D, Kulle B, Klein-Hitpass L, Sellmann L, Dührsen U, Dührig J. „Combined analysis of ZAP-70 and CD38 expression as a predictor of disease progression in B-cell chronic lymphocytic leukemia”. *Leukemia* 2005; 19: 750-58

Speicher MR, Ballard SG, Ward DC. „Karyotyping human chromosomes by combinatorial multicolor FISH”. *Nature genetics* 1996; 12: 368-375

Stilgenbauer S, Döhner H, Bulgar-Mörschel M, Weitz S, Bentz M, Lichter P. „High frequency of monoallelic retinoblastoma gene deletion in B-cell chronic lymphoid leukemia shown by interphase cytogenetics”. *Blood* 1993; 81: 2118-2124

Stilgenbauer S, Bullinger L, Benner A, Wildenberger K, Bentz M, Döhner K, Ho AD, Lichter P, Döhner H. „Incidence and clinical significance of 6q deletions in B cell chronic lymphocytic leukemia”. *Leukemia* 1999; 13: 1331-1334

Stilgenbauer S, Lichter P, Döhner H. „Genetic features of B-cell chronic lymphocytic leukemia”. Rev. Clin. Exp. Hematol.; 2000; 4: 48-72

Stilgenbauer S, Bullinger L, Lichter P, Döhner H, German CLL Study Group (GCLLSG). „Genetics of chronic lymphocytic leukemia: genomic aberrations and V(H) gene mutations status in pathogenesis and clinical course”. Leukemia 2002 Jun; 16(6): 993-1007

Stilgenbauer S, Sander S, Bullinger L, Benner A, Leupolt E, Winkler D, Kröber A, Kienle D, Lichter P, Döhner H. „Clonal evolution in chronic lymphocytic leukemia: acquisition of high-risk genomic aberrations associated with unmutated VH, resistance to therapy and short survival“. Haematologica/The hematology journal; 2007; 92(09): 1242-1245

Telenius H, Carter NP, Bebb CE, Nordenskjöld M, Ponder BA, Tunnacliffe A. „Degenerate oligonucleotide-primed PCR: general amplification of target DNA by a single degenerate primer”. Genomics 1992; 13: 718-725

Thomas L. „Labor und Diagnose”. TH-Books Verlagsgesellschaft GmbH 2008, Frankfurt am Main; 7. Auflage

Travis LB, Curtis RE, Hankey BF, Fraumeni JF. „Second cancers in patients with chronic lymphocytic leukemia”. Journal of the National Cancer Institute 1992; 84: 1422-1427

Van Den Neste E, Robin V, Francart J, Hagemeijer A, Stul M, Vandenberghe P, Delannoy A, Sonet A, Deneys V, Constantini S, Ferrant A, Robert A, Michaux L. „Chromosomal translocations independently predict treatment failure, treatment-free survival and overall survival in B-cell chronic lymphocytic leukemia patients treated with cladribine.” Leukemia 2007 Aug;21(8): 1715-22. Epub 2007 May 31

Wiestner A, Rosenwald A, Barry TS, Wright G, Davis RE, Henrickson SE, Zhao H; Ibbotson RE, Orchard JA, Davis Z, Stetler-Stevenson M, Raffeld M, Arthur DC, Marti GE, Wilson WH, Hamblin TJ, Oscier DG, Staudt LM. „ZAP-70 expression identifies a chronic lymphocytic leukemia subtype with unmutated immunoglobulin genes, inferior clinical outcome, and distinct gene expression profile”. Blood 2003; 101: 4944-4951

Ye BH, Chaganti S, Chang CC, Niu H, Corradini P, Chaganti RS, Dalla-Favera R. „Chromosomal translocations cause deregulated BCL6 expression by promoter substitution in B cell lymphoma”. EMBO Journal 1995; 14: 6209-6217

Zenz T, Häbe S, Denzel T et al. „17p deletion in CLL: Detailed analysis of TP53 mutations, alternative mechanisms of p53 inactivation, clone size and clonal evolution. Blood (ASH Annual Meeting Abstracts) 2008; 112: 782

7. Anhang

7.1. Verwendete Reagenzien im Material- und Methodenteil

7.1.1. SSC (20×): Natriumchlorid/ Natriumcitrat

3M Natriumchlorid (NaCl)

0,3M Natriumcitrat

Ansatz für 1 Liter

175,3g NaCl

88,2g Natriumcitrat

mit Aqua bidest ad 1 Liter auffüllen

Lösung auf pH 7 einstellen

daraus wird 1×, 2× und 4× SSC hergestellt

7.1.2. 4× SSC/ 0,2% Tween 20

Ansatz für 1 Liter:

200ml 20× SSC (s.o.)

798ml Aqua bidest

2ml Tween

Lösung auf pH 7 einstellen

7.1.3. PBS (10×): Phosphate Buffered Saline

137mM Natriumchlorid

2,7mM Kaliumchlorid

4,3mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$

1,4mM KH_2PO_4

Ansatz für 1 Liter:

80g NaCl

2g KCl

14,5g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$

2,4g KH_2PO_4

mit Aqua bidest auf 1 Liter auffüllen

Lösung auf pH 7 einstellen

daraus wird 1× PBS hergestellt

7.1.4. TAE- Puffer (50×): Tris/ Acetat/ EDTA

40mM Tris Acetat

2mM EDTA

daraus wird 1× TAE hergestellt

7.1.5. FACS-Puffer-Lösung

1x PBS

≤5% FCS

0,1% NaN₃